

UCH-FC
MAG-Q
G.643
C.1

**Influencia del residuo vegetal de maíz en la
biodegradación de ^{14}C -Atrazina en un suelo
agrícola chileno**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Químicas

Facultad De Ciencias

Por

Marcela Angélica González Moreno

Octubre, 2016

**Director de Tesis:
María Inés Toral**

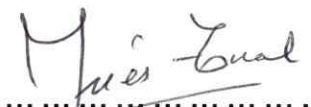
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.


Marcela Angélica González Moreno

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 26-Agosto-2016.


Director de Tesis:
Dra. María Inés Toral


.....

Co-Director de Tesis
Dra. Adriana Nario


.....

Co-Director de Tesis
Sra. Ana María Parada


.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Nicolás Yutronic


.....

Dr. María Angélica Rubio


.....

Dr. Edwar Fuentes


.....

A mi madre y hermanos.

Agradecimientos

Agradezco al Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde la Profesora María Inés Toral me abrió las puertas de su laboratorio apoyándome diariamente en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco también a la Sección de Agricultura de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, por darme la oportunidad de realizar una nueva investigación bajo su tutela y su constante apoyo, experiencias que nunca olvidaré.

INDICE DE CONTENIDOS

I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes generales.....	1
1.1.1 Prácticas Agrícolas.....	1
1.1.2 Efecto de la cero labranza en las propiedades del suelo.....	2
1.2 Plaguicidas.....	3
1.2.1 Plaguicida en estudio.....	6
1.3 Dinámica de plaguicidas en suelos.....	9
1.3.1 Procesos a los que se enfrentan los plaguicidas.....	10
1.3.2 Características del suelo que influyen en la dinámica de los plaguicidas en el suelo.....	13
1.3.2.1 Influencia del residuo orgánico en plaguicidas.....	14
1.3.3 Propiedades de los plaguicidas que determinan su dinámica en el suelo.....	16
1.4 Persistencia de los plaguicidas.....	17
1.4.1 Biodegradación.....	17
1.4.2 Tiempo de vida media.....	21

1.5 Técnica isotópica.....	22
1.5.1 Contador de centelleo líquido.....	24
1.6 Hipótesis.....	26
1.7 Objetivo general.....	26
1.7.1 Objetivos específicos.....	26
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 Materiales.....	27
2.2 Procedimiento experimental.....	28
2.2.1 Recolección de la muestra de suelo.....	28
2.2.2 Residuo vegetal.....	29
2.2.3 Plaguicida en estudio.....	31
2.2.4 Caracterización físico química del suelo.....	32
2.2.5 Recuento microbiano del suelo.....	33
2.2.6 Determinación de la biodegradación y tiempo de vida media de ¹⁴ C-Atrazina.....	35
2.2.6.1 Preparación de solución de ¹⁴ C-Atrazina.....	36
2.2.6.2 Aplicación de plaguicida al suelo.....	36

2.2.6.3 Incubación de las muestras de suelo con ^{14}C - Atrazina.....	37
2.2.6.4 Cuantificación de la biodegradación de ^{14}C - Atrazina.....	39
2.2.6.5 Determinación de ^{14}C -Atrazina residual en el suelo.....	41
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
3.1 Caracterización físico química del suelo.....	43
3.2 Determinación de la biodegradación de ^{14}C -Atrazina.....	47
3.3 Determinación del tiempo de vida media de ^{14}C -Atrazina.....	52
V CONCLUSIONES.....	61
VI REFERENCIAS.....	63
VII ANEXOS.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades físico-químicas de Atrazina.....	8
Tabla 2: Unidades de medida de la actividad y sus equivalencias.....	25
Tabla 3: Caracterización físico química del suelo en estudio al inicio y al final del análisis.....	43
Tabla 4: Resultados de ANOVA para análisis de pH en los 3 tratamientos en estudio.....	45
Tabla 5: Resultados de ANOVA para análisis de Materia Orgánica en los 3 tratamientos en estudio.....	45
Tabla 6: Resultados de ANOVA para análisis de Nitrógeno total en los 3 tratamientos en estudio.....	45
Tabla 7: Clasificación de plaguicidas según su persistencia.....	57
Tabla 8: Balance final de los porcentajes de recuperación de ¹⁴ C-Atrazina.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mercado mundial de plaguicidas 2003-2008.....	4
Figura 2: a) Toneladas anuales brutas de plaguicidas agrícolas vendidos en Chile. b) Porcentaje de crecimiento del PIB Silvoagropecuario respecto al año 1996.....	5
Figura 3: Estructura molecular de Atrazina.....	6
Figura 4: Dinámica de plaguicidas en el suelo.....	10
Figura 5: Ruta de biodegradación de Atrazina.....	20
Figura 6: Residuo vegetal de maíz 2 mm.....	30
Figura 7: Residuo vegetal de maíz 1 cm.....	30
Figura 8: Atrazina marcada con ^{14}C	32
Figura 9: Disolución para incubación microbiana del suelo.....	34
Figura 10: Recuento microbiano en placas Petri.....	35
Figura 11: División para aplicación de ^{14}C -Atrazina.....	37
Figura 12: Incubación de muestras de suelo fortificado.....	39
Figura 13: Contador de centelleo líquido.....	40
Figura 14: Cubetas de porcelana con suelo para combustionar.....	42

Figura 15: Biodegradación de ^{14}C -Atrazina en los 3 tratamientos del suelo.....	47
Figura 16: Curva de degradación de ^{14}C -Atrazina.....	54

RESUMEN

El herbicida Atrazina es un plaguicida ampliamente utilizado en la agricultura. Debido al gran uso de estos productos y el constante mejoramiento de las prácticas agrícolas es que el conocimiento del destino luego de la aplicación de este herbicida es importante, de este modo se puede prevenir y minimizar la contaminación de diferentes comportamientos ambientales.

Una técnica agrícola en ascenso es la aplicación de rastrojo en las plantaciones, ésta contribuye a mejorar las condiciones del suelo, ya que además de entregar macro y micronutrientes, puede influir en la estructura del suelo, oxigenación y humedad, mejorando así la fertilidad.

En este trabajo se estudió la influencia de residuo vegetal de maíz en las propiedades físico químicas del suelo y la biodegradación de ^{14}C -Atrazina en un suelo agrícola de la Región de la Araucanía. Se consideró la biodegradación del plaguicida en un suelo sin presencia del residuo (T1) y con presencia de residuo en dos tamaños diferentes, de 2 mm (T2) y 1 cm (T3).

Se consideró una concentración de Atrazina según consideraciones AFIPA, para lo cual se utilizó una solución de plaguicida sin marcar a la cual se

agregó Atrazina marcada con ^{14}C para lograr una determinada actividad (dpm) en una solución de CaCl_2 0,01 M. La solución fue agregada al suelo y homogenizada mediante rotación.

La concentración de plaguicida biodegradado se determinó por la concentración de $^{14}\text{C}\text{-CO}_2$ retenido en viales con NaOH 0,1 M para lo cual se cuantificó la actividad (dpm) de las muestras en un Contador de Centelleo Líquido (CCL). Además el suelo fortificado se combustionó en un Oxidizador Biológico donde las moléculas de plaguicida marcado se degradan hasta $^{14}\text{C}\text{-CO}_2$, con esta metodología se pretende determinar el tiempo de vida media del plaguicida en estudio.

El rastrojo de maíz no afecta a las características físico químicas del suelo analizadas (pH, contenido de materia orgánica y contenido de nitrógeno total) ya que no sufrieron cambios significativos ($p < 0,05$ en los 3 casos) comparando los valores al inicio al final del estudio. Los porcentajes de biodegradación de ^{14}C -Atrazina luego de 124 días mostraron una diferencia significativa entre el tratamiento de suelo sin residuo vegetal de maíz (T1) versus los tratamientos con residuo vegetal de 2 mm (T2) y 1 cm (T3). Luego del período de estudio no se logró determinar el tiempo de vida media de ^{14}C -Atrazina.

ABSTRACT

Atrazine herbicide it is widely used as a pesticide in agriculture. Due it's frequent use it has become important to know the final destiny of this pesticide, this way we can prevent and minimize the pollution in different environmental behaviors.

The use of stubble applied in farming has been rising, this agricultural technique contributes to improve the soil conditions; besides being a source of micro and macro nutrients, it can influence the soil structure, oxygenation, moist, therefore, improve fertility.

This work studied the influence of the corn stubble in the physicochemical properties of the soil and biodegradation of ^{14}C -Atrazine in a farming land in the Araucanía region. It was considered the biodegradation of the pesticide in three different conditions, soil without presence of corn stubble (T1) and with two different sizes of stubble, 2mm (T2) y 1cm (T3).

It was considered a concentration of Atrazine according AFIPA. In order to fulfill this standard and be able to get a determined activity in a solution of CaCl_2

0,01 M, a solution of unlabeled pesticide it was used, with a portion of Atrazine labeled with ^{14}C added to it. This solution was incorporated and homogenized through rotation in the soil.

The concentration of pesticide biodegraded was determined by the concentration of $^{14}\text{C-CO}_2$ retained in vials con NaOH 0,1 M. To do this the activity (dpm) of the samples were quantified in a liquid scintillation counter (CCL). Furthermore the fortified soil was burned in a Biological Oxidizer where the molecules of labeled pesticide are degraded to $^{14}\text{C-CO}_2$. This methodology is to determine the half life of the studied pesticide.

Corn stubble does not affect the physicochemical characteristics of the soil analyzed (pH, organic matter, and total of nitrogen content), because there was no significant difference ($p < 0,05$ in the three cases) when comparing the baseline values with the values at the end of the study. Biodegradation rates of $^{14}\text{C-Atrazina}$ after 124 days showed significant difference between treatment of bare soil (T1) versus treatments with stubble of 2mm (T2) and 1cm (T3). It was not possible to determine the half-life of $^{14}\text{C-Atrazine}$ after the period of study.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales.

1.1.1 Prácticas Agrícolas.

La inherente necesidad de aumentar y mejorar los procesos productivos en la agricultura, ha llevado a utilizar diferentes técnicas agrícolas como la rotación de cultivos, uso de fertilizantes y plaguicidas, entre otros.

Los plaguicidas están destinados a controlar la gran cantidad de plagas que afectan a las plantaciones, mientras que el residuo vegetal se utiliza con el objeto de abonar el suelo y así, mejorar la calidad de éste, como también disminuir los residuos generados al momento de la cosecha o del recambio del cultivo.

El uso de rastrojo o residuo vegetal es utilizado como sistemas de manejo de suelo llamado mínima y cero labranza. En sus inicios fue utilizado en suelos con gran pendiente, con el fin de contrarrestar la erosión del suelo. Actualmente, plantaciones que utilizan la cero labranza se consideran como uno de los sistemas productivos más sustentables (Acevedo y col, 2003), siendo utilizado en todo tipo de suelos.

La cero labranza consiste en mantener los residuos del cultivo anterior en el suelo y poner las semillas directamente sobre éste (OECD, 2001). Así, el rastrojo se va degradando lentamente generando un cambio en las características físico químicas del suelo, aumentando principalmente el contenido de materia orgánica y la población microbiana.

1.1.2 Efecto de la cero labranza en las propiedades del suelo.

La aplicación de rastrojo en las plantaciones agrícolas se espera que contribuya a mejorar las condiciones del suelo, ya que además de funcionar como compost entregando macro y micro nutrientes, influye en la estructura del suelo, oxigenación y humedad (Briceño, 2007), consiguiendo una mejora en la fertilidad de éste.

Cabe destacar que el rastrojo además de apoyar la incorporación de materia orgánica y mejorar la estructura, sirve (dependiendo del tipo de cultivo y de rastrojo) como cobertura del suelo para disminuir el impacto de la gota de lluvia, como para también disminuir la presencia de malezas por falta de luminosidad directa al suelo. El rastrojo debe ser compatible con el cultivo ya que hay algunos que generan exudados y generan un impacto negativo hacia el cultivo objetivo.

La alteración de las características físicas y químicas del suelo, específicamente, el mejoramiento en la actividad microbiana esperada gracias a la adición de material orgánico al suelo, provocan una alteración en los procesos a los que se ven enfrentados diferentes compuestos como metales pesados, hidrocarburos, pesticidas, entre otros.

En conclusión, dentro de las ventajas que se puede esperar de la cero labranza se encuentra la disminución de la erosión del suelo y el aumento de la fertilidad (FAO, 2012) debido al contenido de materia orgánica y actividad microbiana que se incrementa con el uso de residuos vegetales. A pesar de las ventajas encontradas en esta práctica existen también ciertas limitaciones en el uso de la técnica, como por ejemplo la mineralización de carbono orgánico, alteración en la germinación de las semillas (Briceño, 2007), entre otros.

1.2 Plaguicidas.

Los plaguicidas son sustancias químicas de origen natural o sintético, los cuales son utilizados para controlar o eliminar plagas. Estos compuestos están destinados principalmente a proteger la salud de la población y las producciones agrícolas. Su uso es cada vez mayor debido al aumento constante en la producción de alimentos para satisfacer las necesidades de

la población mundial. A escala global, el mercado de estos compuestos está en aumento principalmente en Europa y Latinoamérica (Figura 1), siendo los herbicidas los más utilizados.

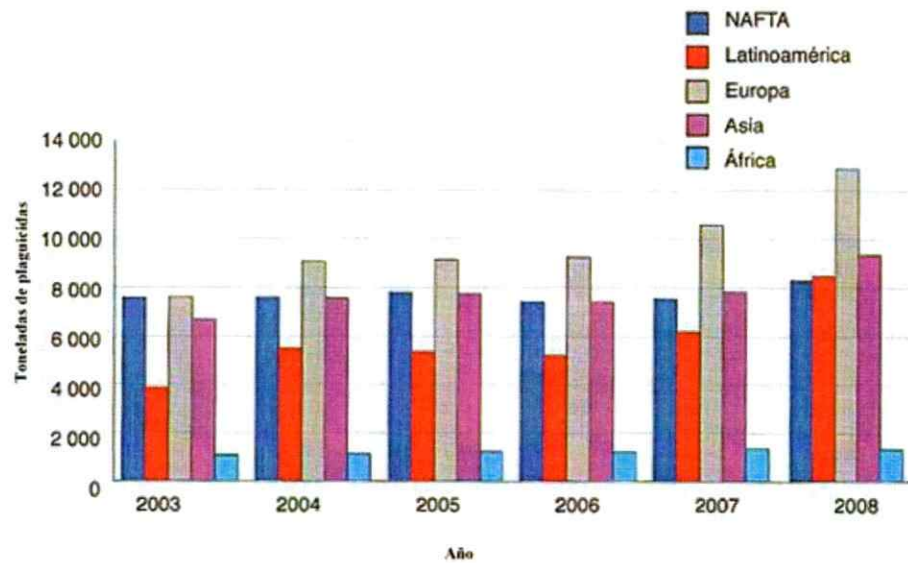


Figura 1: Mercado mundial de plaguicidas 2003-2008. (Solomon, 2013)

En Chile, los volúmenes de plaguicidas vendidos en el país también han mostrado un aumento en los últimos 10 años, acompañado del crecimiento del PIB silvoagropecuario en el mismo período, tendencia que se observa en la Figura 2.

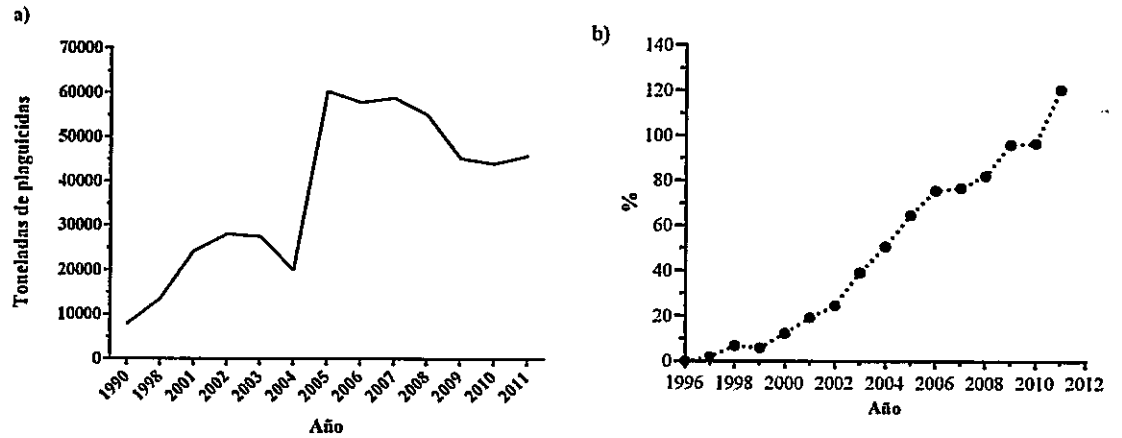


Figura 2: a) Toneladas anuales brutas de plaguicidas agrícolas vendidos en Chile (SAG, 2014). b) Porcentaje de crecimiento del PIB Silvoagropecuario respecto al año 1996 (ODEPA, 2014).

El objetivo del uso de plaguicidas es de amplio espectro, destacándose principalmente 2 propósitos (Solomon, 2013):

- ✓ Aumentar cosechas y calidad de la producción en la agricultura.
- ✓ Proteger la salud humana.

A pesar de las grandes ventajas que ofrece el uso de los agroquímicos, existen posibles inconvenientes, en especial si se hace un uso incorrecto de estos agroquímicos, 4 son los principales problemas:

- ✓ Contaminación de los suelos.
- ✓ Contaminación de las aguas superficiales y/o subterráneas.

- ✓ Resistencia de los organismos a los diferentes plaguicidas.
- ✓ Eliminación de organismos no blanco.

1.2.1 Plaguicida en estudio.

Atrazina (6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina), es un herbicida selectivo y sistémico con acción residual y foliar. Su aplicación puede realizarse en pre y post emergencia, el uso de este herbicida está destinado principalmente al control de malezas de hoja ancha y gramíneas (IUPAC, 2015). Su estructura molecular se muestra en la Figura 3.

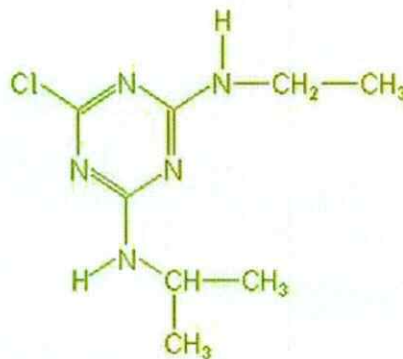


Figura 3: Estructura molecular de Atrazina.

La Atrazina fue introducida en los mercados europeos en el año 1957, rápidamente su uso se expandió al resto del mundo. En el año 2004 Estados

Unidos prohibió su uso, sin embargo, se permitió utilizar el producto ya almacenado hasta el año 2005. La principal causa de su prohibición se debe a que este agroquímico ha sido detectado en altas concentraciones tanto en aguas superficiales y subterráneas como en suelos y sedimentos (Martinazzo, 2010).

A pesar del amplio conocimiento que existe de la Atrazina y sus potenciales impactos negativos, ya que se ha demostrado que el uso prolongado de Atrazina ha generado un desarrollo de más de 40 tipos resistentes de especies de maleza de hoja ancha y 17 especies de gramíneas (FAO, 1996), se sigue utilizando ampliamente en Sudamérica. La FAO indica en el Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (2006) que los problemas de gestión de los plaguicidas en los países en desarrollo difieren de los países desarrollados, haciendo énfasis en la insuficiente legislación y escasa aplicación del reglamento, la deficiencia en el almacenamiento y manipulación es éstos y la utilización de plaguicidas para fines inadecuados.

Su método de acción es a través de la inhibición del fotosistema II, la transferencia de electrones del fotosistema II a los citocromos y al fotosistema I es bloqueada, de este modo se inhibe la producción de ATP y NADPH, cesando así la fijación de CO₂, (Solomon, 2013) es decir, la fotosíntesis de la

planta indeseada se interrumpe, como consecuencia, ésta se desnutre por la falta de producción de azúcares y almidones.

La Atrazina, luego de ser aplicada sufre una serie de transformaciones físicas, químicas y biológicas dependiendo de las condiciones propias del medio y condiciones en la cual el plaguicida fue aplicado, generando 3 principales metabolitos, 6-deisopropil atrazina, dietilatrizona y 2-hidroxiatrizona (IUPAC, 2015).

Este agroquímico se caracteriza por ser un compuesto de baja solubilidad en agua, no es volátil y se considera moderadamente tóxico para la mayor parte de vida acuática, gusanos y abejas (IUPAC, 2015). Sus principales características físico químicas se entregan en la Tabla 1.

Tabla 1: Propiedades físico-químicas de Atrazina.

Fórmula molecular	$C_8H_{14}ClN_5$
Masa molar	$215,7 \text{ g mol}^{-1}$
Densidad (20°C)	$1,23 \text{ g L}^{-1}$
Punto de fusión	175 °C
Presión de vapor (25°C)	$0,039 \text{ mPa}$
Solubilidad en agua (20°C)	35 mg L^{-1}
Coefficiente de partición Octanol/Agua (Kow)	$5,01 \cdot 10^2$
Coefficiente de adsorción (Koc)	100

1.3 Dinámica de plaguicidas en suelos.

La dinámica de los plaguicidas en el suelo se ve fuertemente afectada por factores ambientales y características de la matriz donde se encuentren, determinando el movimiento, estabilidad y persistencia de los agroquímicos en el medio ambiente.

Se estima que entre un 30 y un 100 % de los plaguicidas aplicados alcanza la matriz suelo (Miranda, 2013), afectando no solo a los organismos que sea desea eliminar, debido a esto, se hace necesario el estudio de los procesos a los que se enfrentan los plaguicidas luego de ser aplicados, ya que pueden afectar a otros organismos u otras matrices como el agua y el aire. La dinámica de los plaguicidas en la matriz suelo se expresa en la Figura 4.

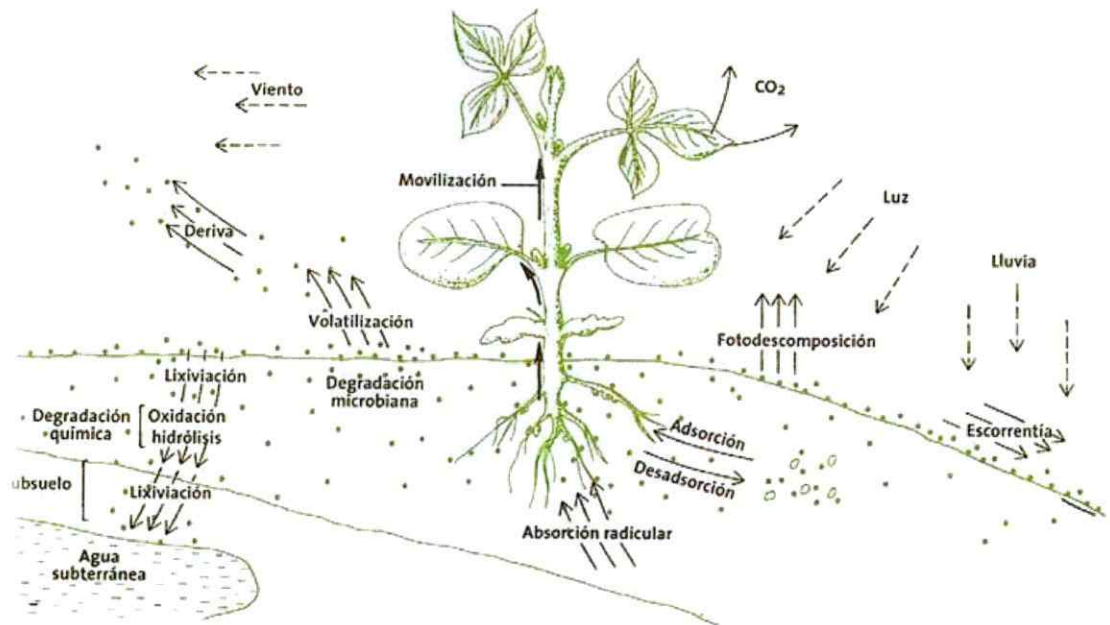


Figura 4: Dinámica de plaguicidas en el suelo (Kogan, 2003).

1.3.1 Procesos a los que se enfrentan los plaguicidas.

Los procesos a los que se enfrentan los plaguicidas se pueden categorizar en 3 grupos: Procesos de Acumulación, Difusión y Transformación (SAG, 2002).

✓ Procesos de Acumulación.

Absorción: Los plaguicidas luego de ser aplicados pueden ingresar al sistema radicular junto con el agua que la planta absorbe y así, desplazarse a través del vegetal por los sistemas vasculares

xilema y floema. Dentro de la planta el plaguicida puede ser degradado o devuelto al ambiente, una vez que la planta se haya destruido.

Adsorción: La adsorción de los plaguicidas es el proceso mediante el cual los coloides del suelo generan una atracción al plaguicida presente en la solución suelo. Luego de ser adsorbidos los plaguicidas pueden enfrentarse al proceso contrario, es decir, la desorción, la cual depende principalmente de la energía de adsorción.

✓ Procesos de Difusión.

Escorrentía: El plaguicida puede ser trasladado gracias al movimiento de agua en superficies con inclinación. La cantidad de plaguicida enfrentado a este proceso depende de la cantidad de agua en el suelo, de las precipitaciones, la solubilidad del plaguicida en agua y la pendiente del terreno.

Lixiviación: El agua que desciende verticalmente a través del perfil del suelo proceso en el que puede arrastrar consigo plaguicida que no haya sido adsorbido ni absorbido, debido a este proceso el

plaguicida puede alcanzar napas subterráneas contaminando zonas aledañas.

Volatilización: El plaguicida puede perderse en forma de vapor, dependiendo de la presión de vapor de cada plaguicida y de las condiciones ambientales, principalmente la temperatura.

✓ Procesos de Transformación.

Degradación fotoquímica: La fotodegradación es generada por la radiación solar, desde 240 hasta 700 nm, espectro donde enlaces como -N= , C=C , C=O y Cl- son destruidos.

Degradación química: Este tipo de degradación es a través de procesos de deshalogenación, dealquilación, oxidación, reducción, hidrólisis, entre otros. Dichos procesos se ven fuertemente determinados tanto por las características físico químicas del suelo como las propiedades de cada plaguicida.

Degradación microbiana: Todos los microorganismos presentes en el suelo presentan en cierto grado la capacidad de

degradar moléculas orgánicas como los plaguicidas con el fin de utilizarlas como fuente de carbono y nitrógeno. Este proceso depende de las condiciones del medio para el desarrollo de los microorganismos como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes.

1.3.2 Características del suelo que influyen en la dinámica de los plaguicidas en el suelo.

El suelo es un sistema complejo constituido por tres fases, sólida, líquida y gaseosa. Estas fases determinan las características del suelo.

La naturaleza coloidal del suelo, es decir, las fracciones coloidales minerales y orgánicas (arcillas y humus respectivamente) y la materia orgánica son los principales responsables de la adsorción de plaguicidas (Sánchez, 1984), pudiendo inmovilizar estos compuestos y así inhabilitar su degradación. Las arcillas debido a su carga eléctrica logran adsorber plaguicidas de carga contraria, su nivel de adsorción puede ser clasificada de muy débil a muy fuerte según sus valores de Koc (INECC, 2011), los plaguicidas enfrentados a adsorción fuerte y muy fuerte, suelen considerarse persistentes ya que su degradación es difícil de lograr.

La estructura y textura del suelo influyen en el destino de los plaguicidas por ejemplo, suelos con estructura granular y alta porosidad facilitan el transporte, oxidación y volatilización de plaguicidas (Freed, 2013), siendo el nivel de volatilización proporcional además con la temperatura que presente el suelo.

El pH de la solución suelo, no sólo afecta a la ionización de plaguicidas con propiedades ácidas o básicas sino que también afecta la estabilidad de las arcillas y la capacidad de intercambio iónico. Así mismo, los microorganismos disponibles para la biodegradación están activados a rangos específicos de pH dependiendo de la especie.

1.3.2.1 Influencia del residuo orgánico en plaguicidas.

La eficiencia de los plaguicidas, su persistencia en el medio y potencial de contaminación están fuertemente ligados a la capacidad de retención en el suelo y su capacidad de degradación química y microbiana, es decir, depende tanto de las características físico químicas del pesticida como del suelo. Estas últimas pueden verse afectadas por el uso de residuo vegetal como práctica agrícola, el uso de rastrojo puede modificar las características físico químicas del suelo (Briceño y col, 2007), sobre todo incrementando los porcentajes de materia orgánica (Moorman y col, 2001).

La incorporación de materia orgánica a los suelos genera cambios positivos como incrementar la fertilidad, modificar la estructura, humedad y propiedades biológicas de los suelos ya que se considera una fuente de nutrientes y de población microbiana como bacterias y hongos. Dichas modificaciones pueden también causar efectos adversos en las propiedades del suelo como por ejemplo, facilitar la mineralización del contenido de carbono orgánico por la oxidación provocada por microorganismos (Briceño y col, 2007) y la modificación de las funciones de la materia orgánica.

-

Es ampliamente conocido que tanto los pesticidas como sus metabolitos pueden formar enlaces y adsorberse en la materia orgánica. Junto con este fenómeno, la biodegradación es otro proceso determinante en la persistencia del plaguicida o sus metabolitos en el medio ambiente, el cual depende de que existan condiciones favorables para población microbiana como la temperatura, pH, humedad, nutrientes entre otros. Factores que se ven directamente afectados o alterados como consecuencia de la aplicación de residuo orgánico vegetal en suelos de cultivo.

1.3.3 Propiedades de los plaguicidas que determinan su dinámica en el suelo.

La naturaleza química de los plaguicidas es determinante en su interacción con el medio ambiente y en especial con la solución suelo. Las características de cada plaguicida como también las propiedades físico químicas del suelo determinarán la capacidad de adsorción, persistencia, solubilidad, entre otros.

Plaguicidas que en su estructura presenten grupos funcionales como P=O, NH, C=O, es decir, que poseen pares de electrones libres, tendrán una mayor adsorción en los coloides del suelo gracias a los puentes de hidrógeno y a los enlaces de Van der Waals que pueden formar (Herwig y col, 2001). Al mismo tiempo, si la adsorción es mayor y por ende la degradación se ve impedida, la persistencia de los agroquímicos será mayor.

Dentro de los constituyentes inorgánicos del suelo, las arcillas son las más reactivas siendo el elemento determinante en la lixiviación de compuestos químicos hacia capas u horizontes inferiores del suelo (Kogan, 2003) e incluso hasta cuerpos de agua subterráneos.

Agroquímicos que en su estructura presentan anillos triazínicos como la Atrazina, son adsorbidos en las arcillas en su forma protonada y neutra dependiendo del pH de la solución suelo, siendo Atrazina una molécula que se

comporta en el suelo como base débil de pKa 1,7 (IUPAC, 2015) será adsorbida por las arcillas de manera protonada cuando la solución suelo esté a un pH cercano a su valor de pKa.

1.4 Persistencia de los plaguicidas.

1.4.1 Biodegradación.

Las diferentes comunidades microbianas presentes en el suelo interactúan tanto química como físicamente con sustancias químicas como plaguicidas. Esta interacción es capaz de afectar su estructura molecular parcialmente o degradando completamente compuestos orgánicos hasta la formación de agua y dióxido de carbono (Briceño y col, 2007). Los microorganismos pueden metabolizar plaguicidas tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos, aunque este último con un menor nivel de eficiencia.

Así, la biodegradación de plaguicidas es un proceso natural donde los microorganismos obtienen energía a través de la metabolización de los agroquímicos utilizados, debido a que son una fuente de energía para la reproducción de las colonias microbianas. Cabe mencionar que los diferentes

microorganismos presentes en el suelo son selectivos, es decir, no tienen la capacidad de degradar todas las moléculas de plaguicidas de igual manera.

Según Singh, (2008) existen 4 parámetros que determinan el grado de biodegradación de los plaguicidas, en primer lugar se encuentra la disponibilidad del plaguicida y/o sus metabolitos a los microorganismos, luego que los microorganismos presentes en el suelo tengan la capacidad de degradar dichas moléculas, que además la población microbiana sobreviva y prolifere en presencia de un agente tóxico como los plaguicidas y finalmente que se cree una población microbiana sustentable.

La atrazina puede ser degradada biológicamente por diferentes bacterias, tales como *Arthrobacter sp. heintzii*, *Chelatobacter*, *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *michiganense*, *Clavibacter*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella ornithinolytica*, y *Agrobacterium tumefaciens* (Solomon y col, 2013), bacterias que se encuentran en el suelo, las cuales logran degradar pesticidas y derivados del petróleo, es decir moléculas de difícil degradación incluso con anillos aromáticos en su estructura.

Dentro de las diferentes bacterias capaces de degradar Atrazina, si se considera condiciones aeróbicas *Rhodococcus* es capaz de metabolizar la Atrazina en desetilatrazina y deisopropilatrazina, mientras que *Pseudomonas* metaboliza la Atrazina en ácido cianúrico en 3 pasos enzimático (Figura 5) donde la mineralización de la Atrazina inicia por la pérdida del átomo de Cl⁻ catalizada por Atrazina clorohidrolasa (AtzA) produciendo hidroxiatrazina donde la degradación continua en presencia de AtzB y AtzC obteniéndose ácido cinúrico, el cual se metaboliza en dióxido de carbono por las reacciones hidrolíticas codificadas por trzD / atzD, trzE / ATZE, y trzF / atzF (Shapir y col, 2002).

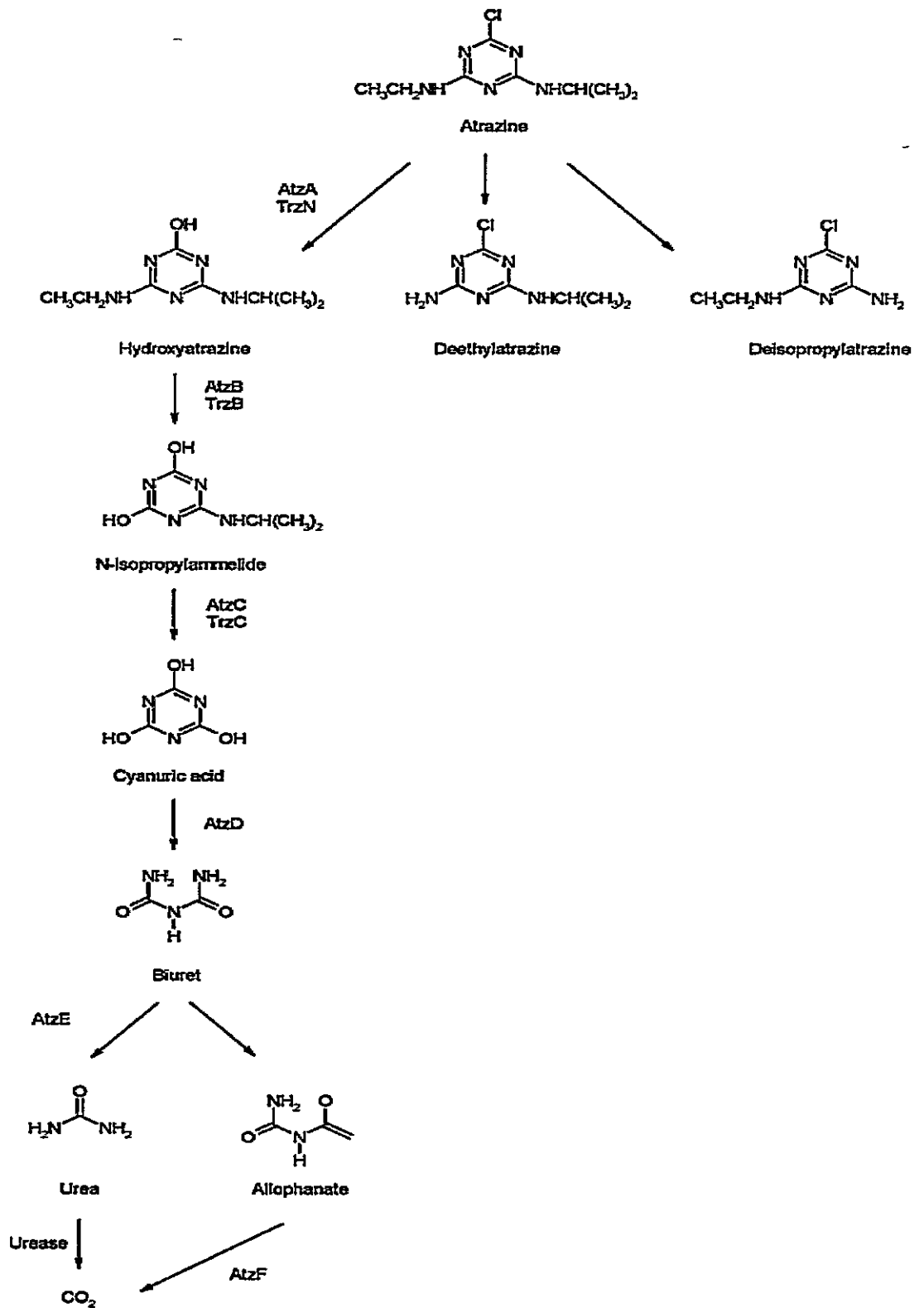


Figura 5: Ruta de biodegradación de Atrazina.

1.4.2 Tiempo de vida media.

El concepto de vida media ($t_{1/2}$) se define como el tiempo en días necesario para que la concentración inicial aplicada de plaguicida sea disipada al 50% tanto por medios físicos, químicos y biológicos, de este modo los plaguicidas se clasifican como poco persistentes si presentan un tiempo de vida media de 0 a 30 días, medianamente persistente si tienen $t_{1/2}$ entre 31 y 90 días y altamente persistentes si su tiempo de vida media se presenta entre los 91 y 180 días.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la persistencia de los plaguicidas depende de las características físico químicas del suelo como del agroquímico. Los modelos propuestos para el estudio de la persistencia de los plaguicidas indican que dependen de una sola variable, la concentración y establecen una relación entre la velocidad de degradación y concentración del plaguicida en un determinado momento (Tuovinen y col, 2015).

Para la determinación del tiempo de vida media, considerando la concentración (Kogan y Pérez, 2003) del plaguicida como factor limitante la reacción de degradación es de primer orden, por lo que se utiliza la siguiente ecuación para su cálculo:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde C_t es la concentración del plaguicida en el tiempo t , C_0 es la concentración inicial y k es la constante de degradación, que al considerar una degradación de primer orden es el valor correspondiente a la pendiente de la curva al graficarla logarítmicamente.

Luego, integrando la primera ecuación (Ec. 1), se obtiene:

$$t = \frac{\ln C_0/C_t}{k} \quad \text{Ec. 2}$$

Finalmente, como se desea determinar el tiempo en el que se alcanza el 50% de la concentración inicial se obtiene que $C_0/C_t = 2$ cuando t es $\frac{1}{2}$, la ecuación queda expresada como:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad \text{Ec. 3}$$

1.5 Técnica isotópica.

Los isótopos son elementos que tienen el mismo número atómico, pero diferente masa atómica. Los radioisótopos, son elementos atómicos que no tienen la proporción correcta de protones y neutrones como para permanecer estables, el átomo emite energía en un intento de disminuirla para aumentar su

estabilidad. Estos elementos se pueden encontrar de manera natural en el ambiente en pequeños porcentajes a pesar de la inestabilidad de su núcleo y de manera artificial como consecuencia de un bombardeo de neutrones (OIEA, 2014).

Los isótopos radioactivos presentan propiedades y comportamiento químico igual al de los isótopos estables, la principal diferencia es que tienen un decaimiento exponencial a lo largo del tiempo, siendo la desintegración nuclear una radiación ionizante en forma de partículas alfa, beta y gamma (FAO/OIEA, 2001).

El uso de técnicas isotópicas presentan importantes ventajas para la investigación ya que el uso de concentraciones utilizadas sea muy bajo manteniendo una sensibilidad muy alta y mediciones muy precisas. Cabe destacar que el uso de estas técnicas requiere de procedimientos específicos y conocimiento avanzado en el área. Los protocolos de seguridad para el uso de técnicas isotópicas de ^{14}C se encuentran en el Anexo 1.

El ^{14}C es ampliamente utilizado como trazador debido a su prolongado tiempo de vida media (5720 años) y decaimiento radiactivo débil donde se expulsa un

electrón desde el átomo, lo cual corresponde a una partícula beta de energía de 0,156 Mev (FAO/OIEA, 2001).

En la agricultura se utilizan isótopos radioactivos dentro de diferentes moléculas como plaguicidas y nutrientes para poder seguir su trayectoria una vez expuestos al medio ambiente, es decir como trazadores. Así, por ejemplo, se puede identificar y cuantificar plaguicidas y sus metabolitos a través de metodologías sumamente sensibles y eficientes.

De este modo, se puede realizar estudios utilizando moléculas de pesticidas con uno o más átomos de su estructura como isótopo radioactivo, sin cambiar las propiedades físicas o químicas del compuesto y determinar los procesos y destinos a los cuales se vio enfrentado el agroquímico luego de su aplicación de manera precisa a pesar de las bajas concentraciones de material radioactivo utilizado.

1.5.1 Contador de centelleo líquido.

El contador de centelleo líquido tiene como propósito medir el decaimiento radioactivo de los isótopos inestables, proceso en donde los radioisótopos son mezclados con una solución que consiste en un solvente orgánico y líquido de

centelleo que contiene flúor, así la energía de decaimiento se transfiere a esta solución transformándose en fotones los cuales debido a su débil señal, son amplificados en un tubo fotomultiplicador que contiene un sistema de diodos, éste amplía la respuesta electrónica hasta un rango adecuado de lectura.

La actividad de un compuesto radioactivo se mide a través de una señal luminosa, la cual se encuentra asociada a un valor en desintegraciones por minuto (dpm). En sus inicios la actividad se medía en Curie (Ci) aunque actualmente la unidad más utilizada es el Becquerel que corresponde a una desintegración por segundo. Las equivalencias de las unidades se presentan en la Tabla 2 (FAO/OIEA, 2001).

Tabla 2: Unidades de medida de la actividad y sus equivalencias.

Unidad	Equivalencia
1 Curie (Ci)	$3,7 \cdot 10^{10}$ Bq
	$2,22 \cdot 10^{12}$ dpm
1 Becquerel (Bq)	60 desintegraciones por minuto (dpm)

1.6 Hipótesis.

La aplicación y el tamaño de partícula de residuos vegetales de maíz a un suelo agrícola modifican la capacidad de biodegradación de Atrazina en éste.

1.7 Objetivo general.

Determinación de la influencia de residuo vegetal de maíz en la biodegradación de ¹⁴C-Atrazina en un suelo agrícola.

1.7.1 Objetivos específicos.

Determinación de parámetros físico-químicos del suelo al inicio del estudio y al final de éste, incluyendo parámetros de pH, materia orgánica y nitrógeno total.

Determinación de la cinética de la biodegradación de la Atrazina en presencia y ausencia de residuo vegetal.

Determinación del tiempo de vida media del plaguicida en presencia y ausencia de residuo vegetal.

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales.

✓ Reactivos.

Acetona (Merck p.a, Suprasolv).

Hidróxido de sodio (Merck, p.a).

Estándar Atrazina 98,8% de pureza (Sigma-Aldrich, Flukar Analytical).

Estándar Atrazina marcada 95% de pureza (IZOTOP).

Líquido de centelleo (Ultima Gold LLT, Perkin Elmer).

Manitol (Calbiochem p.a).

✓ Material de vidrio y otros.

Cubetas de porcelana.

Desecadora.

Espátulas.

Frascos de vidrio con tapa rosca 250 mL (Merck).

Guantes sin vinilo (Health Touch).

Matraz de aforo de 25 mL.

Micropipetas de desplazamiento positivo 50-1000 μL , 3-25 μL (Microman Gibson).

Micropipetas 5 mL (Transferpette, Brand).

Vasos precipitados de 100 y 200 mL.

Viales con tapa rosca.

Viales de penicilina.

✓ **Equipos.**

Balanza de precisión (Sartorius, Industry).

Balanza Analítica (Precisa 100A-300M).

Contador de centelleo líquido (Beckman LS 500 TD).

Desionizador de agua (Millipore).

Estufa a temperatura controlada (UM 500, Memmert).

Oxidizador Biológico (OX-500, Harvey).

Incubadora (SANYO Incubator).

2.2 Procedimiento experimental.

2.2.1 Recolección de la muestra de suelo.

El suelo utilizado en el estudio proviene de la cuenca del río Traiguén en la IX Región de la Araucanía, limita al norte con la cuenca del río Biobío y al sur con la cuenca del río Toltén.

Los principales usos de la cuenca son agrícola y forestal con un 50 y 25% del área respectivamente (Palma y col, 2004), el lugar de estudio presenta cubierta vegetal con plantación de Triticale (cereal híbrido de trigo y centeno).

Se colectó una muestra compuesta de suelo, serie Traiguén de 0 – 10 cm de profundidad mediante técnica de calicata, las coordenadas UTM son 752713m E – 5764855m N, (sistema WGS84, H uso 18).

La granulometría del suelo es de clase textural franco con porcentajes de 14,7, 49,5 y 35,6 para arcilla, limo y arena respectivamente (González, 2015).

2.2.2 Residuo Vegetal.

Se utilizó residuo vegetal procedente de un cultivo de maíz en la Región metropolitana. El residuo se colectó luego de la cosecha del maíz, se separó la planta de la raíz y de la mazorca, la planta se secó en estufa a 65°C por 24 horas. Luego se recolectó residuo de tamaño 2 mm (Fig.6) y de 1 cm de tamaño (Fig. 7).



Figura 6: Residuo vegetal de maíz 2 mm.



Figura 7: Residuo vegetal de maíz 1 cm.

2.2.3 Plaguicida en estudio.

Se utilizó una disolución del plaguicida Atrazina, una solución estándar y una solución de Atrazina marcada, con las siguientes características:

- ✓ Atrazina: Estándar de Atrazina 99,8% de pureza, 2012 (Sigma-Aldrich, Flukar analytical).

- ✓ ¹⁴C-Atrazina: Se utilizó Atrazina marcada, con una actividad de 37MBq, actividad específica de 6,46 MBq·mg⁻¹ y una pureza superior al 95% (IZOTOP,2015). Los carbonos radiactivos se encuentran dentro del anillo triazínico, los cuales se encuentran destacados con un asterisco en la Figura 8.

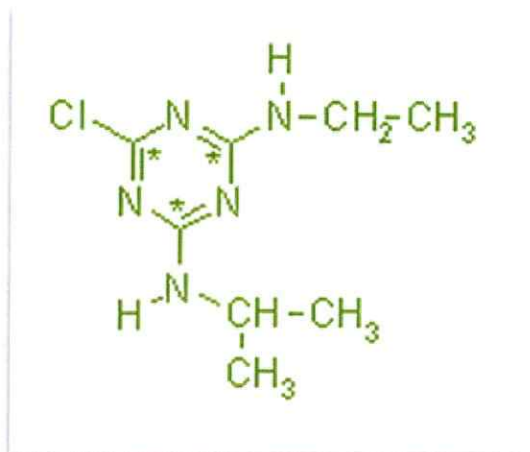


Figura 8: Atrazina marcada con ^{14}C . (IZOTOP, 2015).

2.2.4 Caracterización físico química del suelo.

- ✓ Determinación de pH.

Solución Suelo:Agua (1:2,5) (Sadzawka y col, 2006).

- ✓ Determinación de la humedad.

Factor de corrección por humedad (Sadzawka y col, 2006).

- ✓ Determinación de la capacidad de campo (Sadzawka y col, 2006).

- ✓ Determinación de materia orgánica.

Método de Walkley-Black (Sadzawka y col, 2006).

- ✓ Determinación de Nitrógeno total.

Método de Nitrógeno de Kjeldhal (Sadzawka y col, 2006).

2.2.5 Recuento microbiano del suelo.

Se realizó el recuento microbiano del suelo a 75% capacidad de campo en 2 instancias, al inicio del ensayo se realizó en duplicado al suelo sin residuo vegetal y al final del estudio en los 3 tratamientos en duplicado.

Adicionalmente se llevó a cabo un estudio de la evolución de población microbiana en suelo incubado a 75% de capacidad de campo durante una semana donde se realizó el recuento microbiano diariamente. Todos los estudios se realizaron en el laboratorio de microbiología de la CCHEN, según protocolos del Manual Bacteriológico Analítico (BAM) (FDA, 2015).

Se masó 50 g de suelo a 75% de capacidad de campo los cuales se diluyeron en 700 mL de agua peptonada 0,1% estéril, de esta solución se tomó 1 mL que se agregó a 9 mL de agua peptonada, proceso que se repitió por 4 veces más, de la disolución número 4, 5 y 6 se extrajo 1 mL para incubar en placas Petri en duplicado, finalmente se agregó Agar, un medio de cultivo (Agar Soya Trypticosa) (Figura 9).



Figura 9: Disolución para incubación microbiana del suelo.

Las placas se dejaron por 24 horas en estufa a 35 ± 1 °C, finalmente se realizó el recuento microbiano, es decir, se contaron las colonias microbianas que crecieron en las placas (Figura 10), el resultado se entrega en $\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}$.



Figura 10: Recuento microbiano en placas Petri.

2.2.6 Determinación de la biodegradación y tiempo de vida media de ^{14}C -Atrazina.

Se realizó el ensayo de biodegradación de Atrazina según el protocolo de la OECD para el testeo de químicos (OECD 2014) donde se incubó el suelo a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ sin luz con un vial que contenía NaOH 0,1 M el cual tiene como objeto capturar el $^{14}\text{C}\text{-CO}_2$ proveniente de la degradación completa del plaguicida en estudio.

2.2.6.1 Preparación de solución de ¹⁴C-Atrazina.

Se preparó una solución de Atrazina marcada y Atrazina sin marcar, en una concentración proporcional a lo que se aplica en cosechas. Según las recomendaciones de AFIPA se debe aplicar 1250 g de Atrazina por hectárea, de este modo se preparó una solución para aplicar a 50 g de suelo por lo que se agregó 0,0772 mg de ¹⁴C-Atrazina y 5,1228 mg de Atrazina pura lo cual se aforó en acetona a 25 mL.

2.2.6.2 Aplicación de plaguicida al suelo.

Se distribuyó 5 kg de suelo previamente tamizado a 2 mm y secado al aire en 4 bandejas de vidrio las cuales se subdividieron en 80 cuadros como se demuestra en la Figura 11. Se aplicó alícuotas de ¹⁴C-Atrazina a cada cuadro de manera homogénea.



Figura 11: División para aplicación de ^{14}C -Atrazina.

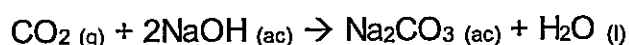
Luego de la distribución equitativa de la solución de ^{14}C -Atrazina en las 4 bandejas se dejaron bajo campana durante la noche para que se evaporara la solución de acetona. Después de 24 horas se juntaron las 4 bandejas en un homogeneizador manual donde mediante rotación el suelo se mezcló. Con tal de comprobar la homogeneidad de la concentración de plaguicida se combustionó 6 muestras en el oxidizador biológico.

2.2.6.3 Incubación de las muestras de suelo con ^{14}C -Atrazina.

En frascos de vidrio con tapa hermética se masó 50 g de suelo previamente fortificado con ^{14}C -Atrazina a los cuales se añadió agua hasta el 75% de capacidad de campo (28 mL). Se consideraron 3 tratamientos, el

tratamiento 1 (T1) consistía en suelo fortificado con ^{14}C -Atrazina, el tratamiento 2 (T2) en suelo fortificado con ^{14}C -Atrazina y 0,5 g de residuo vegetal de tamaño 2 mm, el tratamiento 3 (T3) en suelo fortificado con ^{14}C -Atrazina y 0,5 g de residuo vegetal de 1 cm de tamaño.

Adicionalmente, se introdujo sobre un trípode un vial de vidrio que contenía 5 mL de NaOH 0,1 M. De este modo el ^{14}C -CO₂ liberado por la biodegradación de ^{14}C -Atrazina es capturado por el hidróxido de sodio según la siguiente reacción:



Una vez cerrados los frascos con la soda en su interior se incubaron en incubadora a 20 ± 1 °C a completa oscuridad como se muestra en la Figura 12.



Figura 12: Incubación de muestras de suelo fortificado.

2.2.6.4 Cuantificación de la biodegradación de ^{14}C -Atrazina.

Los frascos con NaOH 0,1 M dispuestos dentro de las botellas herméticas fueron cambiados cada tres días durante las dos primeras semanas del ensayo, luego cada 7 días, así, se evita la saturación del NaOH. De este modo los viales retirados contienen el ^{14}C -CO₂ producido por los microorganismos y materia orgánica presentes en el suelo.

En los días de recambio de frascos se seleccionaron al azar 7 frascos de cada tratamiento de los cuales se extrajo 2 mL y en un vial se les añadió 5 mL de líquido de centelleo. Finalmente se leyó la actividad en desintegraciones por minuto (dpm) de las muestras en el contador de centelleo líquido (Figura 13).



Figura 13: Contador de centelleo líquido.

Se mantuvo la humedad controlada, la cual fue reajustada 1 vez por semana controlando el peso de los frascos, de ser necesario se agregó agua desionizada para volver a alcanzar el peso inicial que indica que el suelo se encuentra al 75% de la capacidad de campo.

2.2.6.5 Determinación de ¹⁴C-Atrazina residual en el suelo.

Para la determinación del tiempo de vida media de ¹⁴C-Atrazina fue necesario cuantificar durante todo el periodo de incubación la ¹⁴C-Atrazina residual presente en el suelo por lo que se retiraron de manera esporádica (1 vez por semana aproximadamente) 2 frascos de cada tratamiento a los cuales se les extrajo el frasco que contenía el hidróxido de sodio.

Los frascos abiertos y con suelo fueron depositados en la estufa a 35°C, hasta que el suelo estuviese completamente seco. Luego en cubetas de porcelana se masó 0,5 g de suelo en duplicado, adicionalmente a cada cubeta se agregó 0,05 g de Manitol. Previamente, a modo como blanco se masó 0,05 g de Manitol, el cual presenta 2 funciones ya que limpia el equipo (Oxidizador Biológico) y elimina la radiación de fondo propia del contador de centelleo líquido.

Las cubetas con suelo fueron combustionadas en un Oxidizador biológico (Figura 14) proceso que sucede a 903°C durante 4 minutos, así, todos los componentes orgánicos, incluido el plaguicida en estudio se degradan hasta CO₂ gaseoso el cual es arrastrado por nitrógeno gaseoso hasta un contenedor de vidrio que contiene 20 mL de líquido de centelleo (Carbon-14). Finalmente todos

los contenedores de vidrio fueron llevados al contador de centelleo líquido para la determinación de la actividad expresada en desintegraciones por minuto.



Figura 14: Cubetas de porcelana con suelo para combustionar.

Cada vez que el Oxidizador Biológico fue utilizado para la combustión de las muestras se determinó el factor de corrección del equipo, combustionando en duplicado 10 μL del estándar de ^{14}C -Atrazina, una alícuota del estándar también se a viales con líquido de centelleo. Ambos viales con ^{14}C -Atrazina estándar combustionada y sin combustionar fueron leídas en el contador de centelleo líquido.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización físico química del suelo.

Se realizaron análisis de caracterización físico química del suelo en estudio, considerando parámetros de pH, materia orgánica, Nitrógeno total y recuento microbiano, tanto al inicio, como al final del análisis, considerando en el último los 3 tratamientos. Los datos se entregan en la Tabla 3.

Tabla 3: Caracterización físico química del suelo en estudio al inicio y al final del análisis¹.

	Inicio del estudio	Final del estudio		
Parámetro	Suelo	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
pH	6,2±0,03	6,6±0,01	6,6±0,02	6,6±0,01
Materia Orgánica (%)	16,29±0,5	17,73±0,2	17,28±0,5	18,19±0,4
Nitrógeno total (%)	0,69±0,02	0,67±0,004	0,66±0,02	0,65±0,01
Recuento microbiano (ufc·g ⁻¹)	9·10 ⁵	9·10 ⁵	3·10 ⁶	2·10 ⁶

¹Tratamiento 1: Suelo fortificado con ¹⁴C-Atrazina.

¹Tratamiento 2: Suelo fortificado con ¹⁴C-Atrazina y residuo vegetal de maíz (2mm).

¹Tratamiento 3: Suelo fortificado con ¹⁴C-Atrazina y residuo vegetal de maíz (1 cm).

Al residuo vegetal de maíz se le determinó el contenido de carbono orgánico total, obteniéndose un 89,25% de CO, el análisis se determinó a través de la combustión de la muestra a 550°C en mufla, de este modo todo el contenido orgánico fue eliminado, generándose así, una diferencia de peso.

Los datos entregados en la Tabla 3 corresponden a la determinación de parámetros físico químicos del suelo en estudio al inicio del estudio (suelo sin ningún tipo de intervención) y al final de éste (considerando el impacto de los 3 tratamientos). Se determinó pH, materia orgánica, contenido de Nitrógeno total y recuento microbiano (Anexo 3).

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) a los datos entregados en la Tabla 3 para los parámetros de pH, Materia Orgánica y Nitrógeno total. Los resultados se entregan a continuación en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4: Resultados de ANOVA para análisis de pH en los 3 tratamientos en estudio.

	Df	Sum. Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Tratamiento	2	$1,578e^{-30}$	$7,889e^{-31}$	1	0,465
Residuals	3	$2,367e^{-30}$	$7,889e^{-31}$	-	-

Tabla 5: Resultados de ANOVA para análisis de Materia Orgánica en los 3 tratamientos en estudio.

	Df	Sum. Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Tratamiento	2	1,177	0,5887	1,497	0,354
Residuals	3	1,180	0,3934	-	-

Tabla 6: Resultados de ANOVA para análisis de Nitrógeno total en los 3 tratamientos en estudio.

	Df	Sum. Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Tratamiento	2	$4,753 \times 10^{-4}$	$2,377 \times 10^{-4}$	1,624	0,333
Residuals	3	$4,391 \times 10^{-4}$	$1,464 \times 10^{-4}$	-	-

El pH obtenido al comienzo del estudio es levemente ácido, alcalinizándose levemente transcurrido el período de estudio para los 3 tratamientos sin encontrarse diferencias significativas entre ellos (Tabla 4). Si todos los tratamientos presentan el mismo pH final de 6,6 se descarta que el cambio encontrado se deba al residuo vegetal de maíz añadido al suelo en el T2 y T3, ya que el tratamiento que no presenta residuo alcanzó el mismo valor. De este modo el único cambio aplicado al suelo fue la fortificación con ^{14}C -Atrazina.

Atrazina presenta un pKa de 1,7 (Footprint, 2016) que se comporta como una base débil en el suelo, mientras que sus 3 principales metabolitos (6-deisopropil Atrazina, desetil Atrazina y 2-hidroxi Atrazina) presentan carácter básico a los cuales se les puede atribuir el leve cambio en el pH del suelo.

Los resultados obtenidos en la determinación de materia orgánica y Nitrógeno Total (%) se mantuvieron constantes, con un $P > 0,05$ en ambos casos (Tablas 5 y 6) es decir, ni el plaguicida ^{14}C -Atrazina, ni el residuo vegetal de maíz aportaron de manera significativa a este parámetro durante el período de estudio.

Finalmente, la población microbiana presente en el suelo aumentó de manera considerable a lo largo del estudio en los tratamientos a los que se aplicó

residuo vegetal. Dicho cambio indica que el rastrojo favorece a la proliferación de los microorganismos en el suelo.

3.2 Determinación de la biodegradación de ^{14}C -Atrazina.

En la Figura 15 se muestra el porcentaje de la biodegradación de ^{14}C -Atrazina en función del tiempo durante los 124 días de estudio.

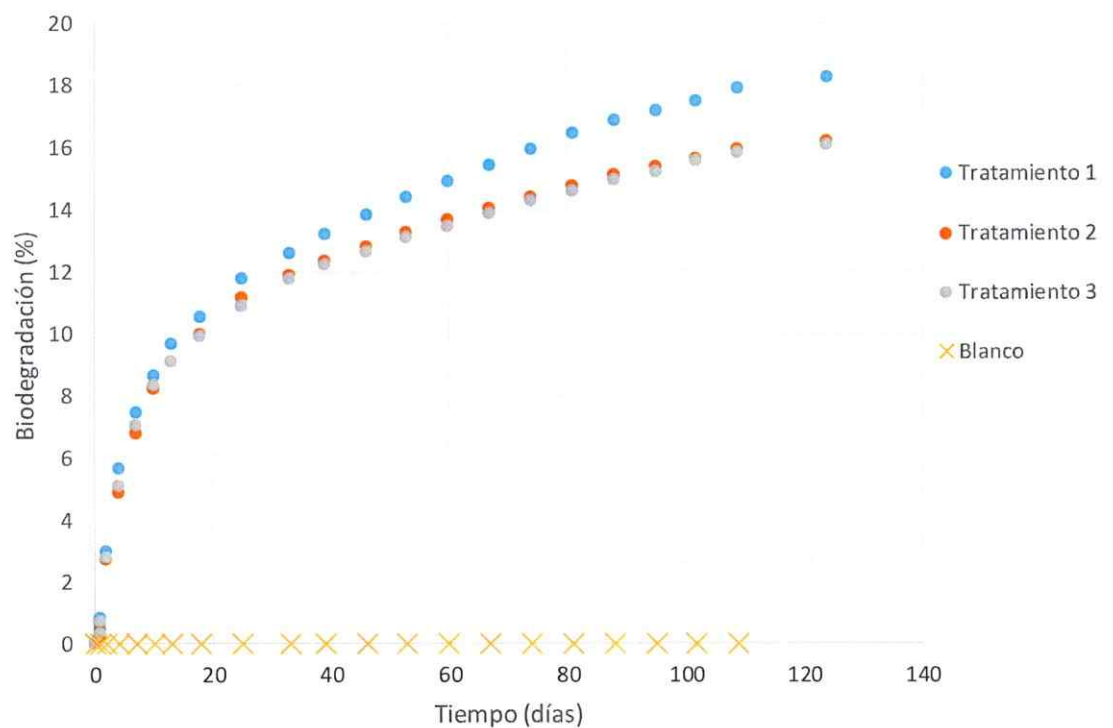


Figura 15: Biodegradación de ^{14}C -Atrazina en los 3 tratamientos del suelo.

El gráfico representa la biodegradación del herbicida ^{14}C -Atrazina. Los datos se expresan en porcentaje de biodegradación obtenido según la actividad en desintegraciones por minuto (dpm) del ^{14}C - CO_2 donde el 100% es la cantidad de plaguicida aplicado al suelo inicialmente a los 3 tratamientos, siendo T1 suelo fortificado con ^{14}C -Atrazina, el T2 suelo fortificado con ^{14}C -Atrazina y residuo vegetal de 2 mm, y el T3 suelo fortificado con ^{14}C -Atrazina y residuo vegetal de 1 cm.

La biodegradación se representa por la concentración recuperada en los viales con NaOH 0,5 M donde quedó retenido el ^{14}C - CO_2 gaseoso. Así, los resultados obtenidos experimentalmente indican que la degradación de la molécula de ^{14}C -Atrazina fue completa hasta la obtención de ^{14}C - CO_2 y amonio.

Dentro de todas las rutas de degradación, tanto química como biológica la ruta más eficiente para lograr una degradación completa, es decir, hasta ^{14}C - CO_2 , H_2O y NH_3 , para el caso de Atrazina, es a través de los microorganismos presentes en el suelo. Es por esto y considerando la ubicación estratégica de los ^{14}C , los cuales se encuentran en el anillo triazínico, que todo el ^{14}C - CO_2 capturado proviene de la biodegradación del herbicida.

En la Figura 15 se observa que la biodegradación de ^{14}C -Atrazina para T1, a pesar de ser particularmente baja, tuvo un máximo diario en el día 4 con $2,65 \pm 0,11$ % de biodegradación, acumulando un 5,66 % de biodegradación parcial. Desde ese día los porcentajes fueron disminuyendo constantemente alcanzando solo un 0,35 % de biodegradación las últimas 2 semanas y al día 124 del estudio un total de biodegradación acumulada de 18,29 %.

Analizando la curva del T2 (Fig. 15) se observa nuevamente que el máximo de la biodegradación se encuentra al cuarto día, pero con un $2,14 \pm 0,01$ % de ^{14}C - CO_2 recuperado y con un porcentaje acumulado correspondiente a 4,88 %, así, al día 124 se obtuvo un porcentaje de biodegradación total de 16,19 %, mientras que para el T3 el máximo porcentaje recuperado también al cuarto día es de $2,29 \pm 0,06$ % y un 5,09 % de porcentaje de recuperación de ^{14}C - CO_2 acumulado, ya para el día 124 solo un 16,1% fue biodegradado.

Se observa con los datos entregados detalladamente en el Anexo 4, que el T1 obtuvo una mayor capacidad de degradación microbiana en comparación con los tratamientos que presentaban residuo vegetal, diferencia que se comienza a apreciar desde el día 25 de estudio.

Todos los suelos presentan microorganismos y existen más de 200 tipos de microorganismos capaces de degradar el herbicida Atrazina (Briceño y col, 2007) a pesar de esto, para lograr la biodegradación de Atrazina es necesario que en el suelo exista no sólo la presencia de microorganismos sino que también el número y actividad de microorganismos que poseen la apropiada capacidad enzimática de degradación. Además se ha determinado que de los 200 tipos de microorganismos capaces de degradar Atrazina, ninguno es capaz de hacerlo por cuenta propia, se necesitan diferentes tipos de colonias para lograr la completa degradación del herbicida (LeBaron y col, 2008).

LeBaron y col (2008) destaca que en la mayoría de los suelos la población microbiana capaz de degradar Atrazina es muy baja o inexistente, la degradación de este herbicida es lenta debido a la ausencia del microorganismo necesario y a las condiciones del medio. La biodegradación se ve limitada en suelos con un contenido de agua insuficiente, donde la concentración de oxígeno es limitada y cuando el pH del suelo es menor a 7.

El suelo en estudio al inicio presenta un pH de 6,2, pH al cual la biodegradación se ve desfavorecida, aunque la Atrazina posee un coeficiente de distribución normalizado (K_f) de 10,9 (González, 1015) indicando que este

herbicida está muy débilmente adsorbido en la materia orgánica y en las arcillas, quedando disponible para la degradación microbiana.

A pesar de que este agroquímico esté disponible en la solución suelo para los microorganismos, según su K_f , el proceso de degradación incluye una variada vía de procesos metabólicos donde la dealquilación es el primer paso, removiendo el grupo etil con mayor facilidad que el grupo isopropil, presente en las cadenas secundarias de la molécula de Atrazina, los cuales los utilizan como energía. Luego en el proceso el Cl es removido mediante hidrólisis quedando un grupo hidroxilo, mientras que la ruptura del anillo es muy difícil de lograr ya que el anillo es muy estable químicamente y los carbonos constituyentes del anillo no son una fuente de energía para la comunidad microbiológica (Lebron y col, 2008), debido a que ya no pueden oxidarse más, es decir, los carbonos se encuentran en el mismo estado de oxidación que los carbonos del CO_2 (estado de oxidación 4+).

Finalmente, se atribuye el bajo porcentaje obtenido de biodegradación de ^{14}C -Atrazina debido a dos principales factores la capacidad de las colonias de microorganismos presentes en el suelo de degradar el plaguicida y el pH de la solución suelo el cual es levemente ácido, estos dos factores condicionan la degradación y la limitan, resultado que encuentra en los 3 tratamientos. Cabe

destacar que a pesar de la baja biodegradación encontrada, los tratamientos con residuo vegetal presentaron una menor biodegradación que el tratamiento de suelo sin rastrojo en 2,2 % aproximadamente considerándose una diferencia significativa debido a la incerteza del método experimental utilizado.

Si se comparan los tratamientos 2 y 3 (T2 y T3) en donde la única diferencia es el tamaño del residuo aplicado, se observa que sólo al principio del estudio presentaron diferencias mínimas, pero al final, obtuvieron prácticamente el mismo porcentaje de biodegradación, indicando así que el tamaño del residuo entre 2 mm y 1 cm no afecta la capacidad de biodegradación de ^{14}C -Atrazina en el suelo de estudio.

3.3 Determinación del tiempo de vida media de ^{14}C -Atrazina.

En conjunto con el desarrollo del estudio de biodegradación de ^{14}C -Atrazina se puede realizar la determinación del tiempo de vida media, así, para la determinación de la biodegradación se analiza el CO_2 capturado en los viales con NaOH y en el suelo se determina la concentración de ^{14}C -Atrazina para el tiempo de vida media.

Para el análisis de determinación del tiempo de vida media se retiraron los frascos de la incubadora y se secaron en la estufa, en el caso de ^{14}C -Atrazina en el suelo de estudio se secan en estufa a $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. La composición granulométrica del suelo en estudio presenta un alto porcentaje de arcillas y limo (14,6% y 49,5% respectivamente) los cuales dificultan el secado del suelo.

Para la determinación del tiempo de vida media se debe conocer el orden de reacción de la cinética de reacción de ^{14}C -Atrazina, para lo cual se grafica el tiempo vs el $\text{Ln} [^{14}\text{C}\text{-Atrazina}]$ (Anexo 5), obteniéndose una reacción de orden 1, la cual se analiza en 2 fases debido a la complejidad química de la reacción, indicando que la velocidad de reacción depende de la concentración de ^{14}C -Atrazina.

Los datos obtenidos en el análisis de tiempo de vida media (Anexo 6) luego de la incubación de los suelos se entregan en la Figura 16, donde se muestra la curva de degradación de ^{14}C -Atrazina para los 3 tratamientos en un período de tiempo de 116 días.

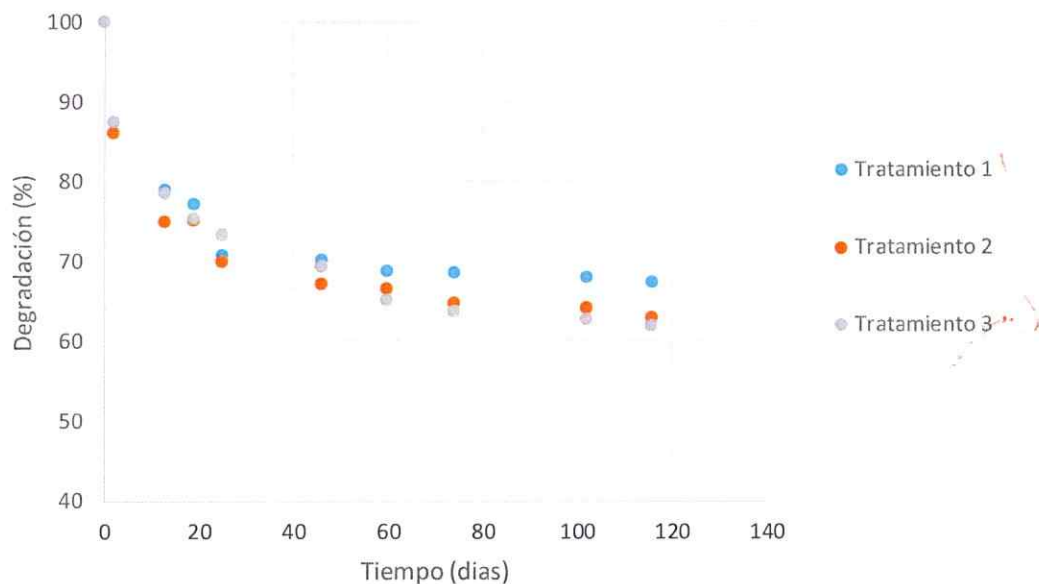


Figura 16: Curva de degradación de ¹⁴C-Atrazina.

En la Figura 16 se observa la curva de degradación de ¹⁴C-Atrazina en el suelo de estudio. Este análisis incluye la degradación química, física y biológica. No se observa diferencia en el porcentaje de degradación en ninguno de los tratamientos, es decir, en este caso, el residuo vegetal de maíz no afecta de manera importante a la degradación de ¹⁴C-Atrazina bajo las condiciones de laboratorio trabajadas.

Se observa, que el tratamiento con residuo vegetal de mayor tamaño (Tratamiento 3) presentó el mayor porcentaje de degradación alcanzando una

diferencia de 5% aproximadamente con el Tratamiento 1, el cual no contiene residuo vegetal. Al finalizar el estudio se encontró un 67, 63 y 62% para los Tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente, es decir, no se alcanzó el tiempo de vida media luego de 124 días de estudio en ninguno de los tratamientos.

Cabe destacar que se recomienda que los estudios de degradación de pesticidas en suelos no superen los 120 días, ya que se espera que trascurrido ese tiempo y bajo condiciones de laboratorio el contenido de población microbiana comience a decrecer (OECD, 2013), alterando las condiciones experimentales. Este proceso difiere de las condiciones ambientales que se trata de imitar en el análisis de laboratorio.

Ya transcurrido 25 días de estudio se recuperó cerca de un 70% de ¹⁴C-Atrazina, desde ese día en adelante la degradación diaria fue disminuyendo degradándose entre un 0,5 y 3 % en los últimos 14 días de estudio. Se infiere que la degradación de ¹⁴C-Atrazina en el suelo de estudio no es favorable y que el residuo vegetal agregado en el Tratamiento 1 y 2 (T1 y T2) no afectó de manera importante la capacidad de degradación del suelo.

El tiempo de vida media se define como el tiempo requerido para que la concentración inicial de plaguicida disminuya al 50% (Kogan y Perez, 2003).

Luego de 116 días de análisis no se alcanzó dicha concentración, por lo que el tiempo de vida media no fue calculado, si se puede decir que ^{14}C -Atrazina presenta un tiempo de vida media mayor a 116 días en el suelo de estudio.

Aunque el contenido de materia orgánica del suelo es elevado fomentando así la población microbiana (LeBaron y col, 2008) y la Atrazina presenta un bajo K_f de 10,9 (González, 2015) indicando mayor disponibilidad para la degradación, no se alcanzó el índice de vida media en el período observado.

Por lo tanto, los resultados encontrados tanto en biodegradación como en degradación concuerdan con diversos estudios que indican que para ^{14}C -Atrazina la degradación química es más importante que la degradación biológica (Howard, 1991) ya que este agroquímico puede hidrolizar tanto en pH ácido como básico, pero no favorece la hidrólisis a pH neutro como el de suelo en estudio.

A pesar de no obtener el tiempo de vida media de ^{14}C -Atrazina luego de 124 días, y realizando una proyección hacia la clasificación general como por ejemplo como la de Zablotowicz (2006), éste indica que la ^{14}C -Atrazina se considera moderadamente persistente en suelos con tiempos de vida media que van desde los 30 días hasta 1 año, del mismo modo Ramírez y Lascaña (2001) presentan una Tabla Resumen (Tabla 7) donde se clasifican los plaguicidas

según su grado de persistencia. De acuerdo a esta clasificación el agroquímico en estudio se catalogaría al menos como moderadamente persistente, ya que al día 124 sólo alcanzó un 60% aproximadamente de concentración aplicada.

Tabla 7: Clasificación de plaguicidas según su persistencia.

Persistencia ^a	Vida media ^b	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

^a Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

^b Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

El 60% de concentración aproximada encontrada al final del estudio indica que un 40 % del plaguicida aplicado inicialmente se degradó. Se puede realizar un balance general donde el valor de concentración encontrado en el suelo y el valor obtenido de biodegradación debe sumar 100% ya que la concentración

encontrada en el suelo incluye moléculas de ^{14}C -Atrazina y de sus principales metabolitos.

Dichas moléculas presentan en su estructura átomos de ^{14}C por lo que se sabe con exactitud su concentración a pesar de que no es posible distinguir la proporción en este estudio de moléculas ya que todas emiten el mismo tipo de radiación. Se entrega el balance final en la Tabla 8.

Tabla 8: Balance final en los porcentajes de recuperación de ^{14}C -Atrazina.

Tratamiento	Biodegradación (%)	^{14}C -Atrazina en el suelo (%)	Total de ^{14}C -Atrazina (%)
T1	18,3	67,3	85,6
T2	16,2	62,8	79
T3	16,1	61,9	78

Los porcentajes de recuperación de ^{14}C -Atrazina están dentro de los rangos aunque bajo el 90% en los 3 tratamientos. Este resultado se atribuye a que para realizar el análisis del suelo fue necesario secarlo en estufa debido a que durante el estudio el suelo se encontraba al 75% de capacidad de campo. El secado se realizó a $34 \pm 1^\circ\text{C}$, temperatura a la cual el principal metabolito de ^{14}C -

Atrazina (desetil Atrazina) se volatiliza fácilmente debido a su al Constante de Henry a 20°C, que alcanza los 980 Pa m³ mol⁻¹ (Footprint, 2016).

Finalmente se concluye que el residuo vegetal modifica en un 2,2% la biodegradación de ¹⁴C-Atrazina en el suelo de estudio a los 124 días de análisis, es decir, la dinámica de ¹⁴C-Atrazina se ve alterada según las prácticas agrícolas utilizadas.

Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que suelos con un historial de aplicación de Atrazina presentan una mayor capacidad de biodegradación que aquellos suelos sin aplicaciones previas del herbicida (Tyler y col, 2013). Se infiere que las colonias microbianas capaces de degradar Atrazina prevalecen ante las colonias incapaces al estar en presencia del agroquímico.

Por lo tanto, en términos agronómicos y medioambientales el uso de residuo vegetal como práctica de abono y disminución de residuos en las producciones agrícolas alteran indiscutiblemente la dinámica de ¹⁴C-Atrazina en el suelo de estudio.

Es importante señalar que si el herbicida disminuye su capacidad de degradación está durante un período de tiempo mayor disponible para la

protección de los cultivos, así mismo, su baja capacidad de adsorción como se mencionó anteriormente también permiten que la Atrazina se mantenga activa.

Por otro lado, un pesticida que no tenga una alta capacidad de adsorción en el suelo, y se considere persistente en la matriz del suelo indica que está susceptible a transporte por arrastre o lixiviación poniendo en riesgo la calidad de cuerpos de aguas cercanos al lugar de la aplicación, hecho que se debe considerar, ya que existe una alta precipitación anual en el lugar de estudio.

Debido a la gran variedad de factores y consecuencias que genera un solo cambio en las prácticas de agricultura es que se debe considerar y estudiar constantemente la dinámica de los plaguicidas en la matriz suelo, ya que pequeños cambios en sus características físico-químicas pueden afectar directamente al comportamiento y destino de los plaguicidas. Los estudios deben hacerse continuamente mejorando las técnicas de laboratorio, por ejemplo, sería de gran aporte si se pudiese incorporar la determinación de metabolitos en el estudio realizado. Cabe destacar que en este trabajo no se cuantificó los metabolitos debido a que la técnica isotópica dificulta la medición.

V CONCLUSIONES

Luego de un período de 124 días, en los que se realizó el estudio para determinar la influencia del residuo vegetal de maíz en la biodegradación y tiempo de vida media de ^{14}C -Atrazina en un suelo agrícola, se concluye lo siguiente:

- ✓ El contenido de Nitrógeno total y de materia orgánica no se ve afectado por la aplicación de ^{14}C -Atrazina y de residuo vegetal de maíz en el suelo de estudio, por otro lado el pH se ve afectado levemente acercándose a un valor neutro. El recuento microbiano se vio favorecido solo en los tratamientos que contenían residuo vegetal de maíz.
- ✓ El residuo vegetal disminuye de manera significativa la capacidad de biodegradación de ^{14}C -Atrazina en el suelo de estudio aproximadamente en un 2,2%.
- ✓ El tiempo de vida media de ^{14}C -Atrazina en el suelo de estudio no logró determinarse luego de 124 días de análisis, llegando a considerarse al menos moderadamente persistente.

- ✓ La recuperación del método estuvo dentro de los rangos aceptados (70-120%) para los 3 tratamientos.

- ✓ La hipótesis planteada se cumple ya que existe una influencia del residuo vegetal de maíz en la biodegradación de ^{14}C -Atrazina en el suelo de estudio.

VI REFERENCIAS

- ✓ Acevedo, E. Silva, P. 2003. Libro Agronomía de la cero labranza. Universidad de Chile, serie ciencias agronómicas N°10.
- ✓ Briceño, G. Palma, G. Durán, N. 2007. Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. Critical reviews in environmental science and technology, 37:233-271.
- ✓ FAO, 1996. Manejo de malezas para países en desarrollo. ISSN: 1014-1227.
- ✓ FAO, 2006. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas, versión revisada.
- ✓ FAO, 2012. No-Till Farming and the Environmental. Outlook on pest management. DOI: 10.1564.
- ✓ FAO/OIEA, 2001. Agriculture and Biotechnology Laboratory. Manual, Use of isotope and radiation methods in soil and water management and crop nutrition. 247 pp.
- ✓ FDA, 2015. Bacteriological Analytical Manual, BAM. Disponible en: www.fda.gov
- ✓ Freed, V. 2013. Environmental Dynamics of pesticides. Environmental science research. Editorial Board.
- ✓ González, M. 2015. Determinación del coeficiente de distribución de plaguicidas en suelo y su potencial movilidad hacia cuerpos de agua

utilizando técnicas isotópicas. Seminario de título, Química Ambiental, Universidad de Chile

- ✓ Herwig, U. Klumpp, E. Narres, H. Schwuger, M. 2001. Physicochemical interactions between atrazine and clay minerals. *Applied Clay Science* 18, 211-222. Elsevier.
- ✓ Howard, P. 1991. *Handbook of Environmental. Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Volume III. Pesticides.* 679 pp. Disponible en: books.google.cl
- ✓ INECC, 2011. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, México. Los plaguicidas y su transporte en el ambiente. Características físico químicas de los plaguicidas y su transporte en el ambiente. Disponible en: www.2.ine.gob.mx Visitado en Octubre, 2015.
- ✓ IUPAC, 2015. International union of pure and applied chemistry. Global Availability of Information on Agrochemicals. Disponible en: sitem.herts.ac.uk
- ✓ IZOTOP, 2015. Atrazine, [Ring-U-14C]. Disponible en: www.izotop.hu Visitado en: Octubre 2015
- ✓ Kogan, M. Pérez, A. 2003. *Herbicidas, fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción.* Ediciones Universidad Católica de Chile. 333 p.
- ✓ LeBaron, H. McFarland, J. Burnside, O. 2008. *The Triazine Herbicides. 50 Years Revolutionizing Agriculture.* Capítulo 22, Microbial degradation of s-Triazine Herbicides. Elsevier. 575 p.

- ✓ Martinazzo, R. Jablonowski, N. Hamacher, G. Dick, P. Burauel, P. Accelerated degradation of ^{14}C -Atrazine in Brazilian soils from different regions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 7864-7870.
- ✓ Miranda, B. 2013. Determinación de curvas de adsorción de plaguicidas en suelos, utilizando técnicas isotópicas. Seminario de título. Química Ambiental, Universidad de Chile.
- ✓ Moorman, T. Cowan, J. Arthur, E. Coats, J. 2001. Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Biol Fertil Soils*. 33:541-545.
- ✓ OECD, 2001. Glossary of statistical terms. Disponible en www.oecd.org, visitado en Septiembre 2015.
- ✓ OECD, 2013. Guideline 307 Aerobic and anaerobic transformation in soil. Guidelone for the testing of chemicals. Disponible en oecd.org Visitado en Enero 2016.
- ✓ OECD, 2014. Guideline 310 Ready Biodegradability CO_2 in sealed vessels (Headspace Test) Guideline for the testing of chemicals. Disponible en oecd.org Visitado en Octubre 2015.
- ✓ Ramírez, J. Lascaña, M. 2001. Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Rev. Riesgos Labor*. 4 (2):67-75.
- ✓ SAG, 2002. Manual de capacitación para el buen uso y manejo de plaguicidas. Lección 9. Disponible en www.sag.cl. Visitado en Octubre 2015.

- ✓ Sanchez, M. Sanchez, C. 1984. Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. Edición electrónica, Salamanca, España. Disponible en: www.ceresnet.com Visitado en: Octubre, 2015.
- ✓ Singh, D. 2008, Biodegradation and bioremediation of pesticides in soil: concept, method and recent developments. *Indian J. Microbiology* 48:35-40
- ✓ Solomon, K. Stephenson, G. 2013. Plaguicidas y ambiente. Editorial UCR.
- ✓ Tuovinen, O. Deshmukh, V. Ozkaya, B. Radosevich, M. (2015) Kinetics of aerobic and anaerobic biomineralization of Atrazine in surface and subsurface agricultural soils in Ohio. *Journal of Environmental Science and Health*. 50:10, 718-726.
- ✓ Tyler, H. Khalid, S. Jackson, C. Moore, T. 2013. Determining potencial for microbial Atrazine degradation in agricultural drainage ditches. *Journal of Environmental Quality*. 42:828-834
- ✓ Zablotowicz, R. Weaver, M. Locke, M. 2006. Microbial adaptation for accelerated Atrazine mineralization/degradation in Mississippi Delta soil. *Weed Science*, 54:538-547.

VII ANEXOS

Anexo 1

Procedimiento básico de protección radiológica para el trabajo en laboratorio

(CCHEN, 1992)

- ✓ Utilizar siempre delantal y dosímetro.
- ✓ Al manipular material radioactivo utilizar doble guante, de este modo se puede desechar el primer guante por si se contamina o rompe.
- ✓ Es preferible que se trabaje acompañado.
- ✓ Está prohibido el trabajo a personas con heridas expuestas.
- ✓ El material radioactivo debe realizarse sobre bandejas de seguridad, con papel absorbente y sobre mesones cubiertos con plástico.
- ✓ El laboratorio debe disponer de diferentes recipientes para el desecho de productos líquidos y sólidos.

Anexo 2

Transformación de actividad en dpm a concentración en mg L^{-1}

Se transforma la actividad específica de cada plaguicida a dpm mg^{-1} según la relación:

$$37 \text{ MBq} = 1 \text{ mCi}$$

$$2,22 \cdot 10^9 \text{ dpm} = 1 \text{ mCi}$$

¹⁴C-Atrazina

Actividad específica: 1,79 MBq mg⁻¹

Actividad específica en dpm mg⁻¹: 107350097 dpm mg⁻¹

Anexo 3

De las tablas 9 a la 23 se presentan los datos de las determinaciones de los parámetros físico-químicos del suelo de estudio al inicio y al final del estudio.

Tabla 9: Curva de calibración de determinación de pH al inicio del estudio.

pH	mv (22 °C)
2	261,6
4	144,8
6	26,5
7	-29,7
9	-134,3
10	-171,2

Tabla 10: Determinación de pH en el suelo al inicio del estudio.

mV (22°C)	pH	Promedio
20,3	6,26	6,23
22,1	6,23	
23,6	6,20	

Tabla 11: Curva de calibración de determinación de pH al final del estudio.

pH	mv (22 °C)
2	255,9
4	143
6	24,2
7	-32
9	-124,5
10	-154,3

Tabla 12: Determinación de pH del suelo en los 3 tratamientos (T1, T2, T3) al final del estudio.

Muestra	mV (22°C)	pH	Promedio
Suelo (T1)	6,25	6,57	6,57
	6,24	6,57	
Suelo + residuo 2 mm (T2)	6	6,58	6,58
	6	6,58	
Suelo + residuo 1 cm (T3)	5,98	6,58	6,58
	5,96	6,58	

Tabla 13: Curva de calibración de determinación de contenido de materia orgánica del suelo al inicio del estudio.

mg CO L ⁻¹	Absorbancia (nm)
0	0,5784
10	0,7965
20	1,1166
40	1,4231
50	1,6252

Tabla 14: Determinación de contenido de materia orgánica del suelo al inicio del estudio.

Muestra	Absorbancia (nm)	mg CO L ⁻¹	%CO	%MO
S1	0,939	15,783	9,470	16,29
S2	0,937	15,686	9,412	
S3	0,938	15,734	9,441	
S4	0,916	14,671	8,803	

Tabla 15: Curva de calibración de determinación de contenido de materia orgánica del suelo al final del estudio.

mg CO L ⁻¹	Absorbancia (nm)
0	0,577
10	0,7883
20	0,9871
40	1,3934
50	1,5985

Tabla 16: Determinación de contenido de materia orgánica del suelo (T1) al final del estudio.

Muestra	Absorbancia (nm)	mg CO L ⁻¹	%CO	%MO
T1	0,893	15,319	9,191	17,73
T1	0,925	16,887	10,132	
T1	0,933	17,279	10,368	
T1	0,935	17,377	10,426	

Tabla 17: Determinación de contenido de materia orgánica del suelo con residuo vegetal de 2 mm (T2) al final del estudio.

Muestra	Absorbancia (nm)	mg CO L ⁻¹	%CO	%MO
T2	0,922	16,74	10,044	17,28
T2	0,928	17,034	10,221	
T2	0,905	15,907	9,544	
T2	0,915	16,397	9,838	

Tabla 18: Determinación de contenido de materia orgánica del suelo con residuo vegetal de 1 cm (T3) al final del estudio.

Muestra	Absorbancia (nm)	mg CO L ⁻¹	%CO	%MO
T3	0,94	17,623	10,574	18,19
T3	0,944	17,819	10,691	
T3	0,925	16,887	10,132	
T3	0,942	17,721	10,632	

Tabla 19: Determinación del contenido de Nitrógeno en el suelo al inicio del estudio.

mg de suelo	mL HCl (0,01 N)	mL NaOH (0,01 N)	% Nitrógeno	Promedio
250	15	3,08	0,67	0,69
255,4	15	2,17	0,70	
253,3	15	2,46	0,69	
250,3	15	2,45	0,70	
250,8	15	3,08	0,67	
250,4	15	2,2	0,72	

Tabla 20: Determinación del contenido de Nitrógeno en el suelo (T1) al final del estudio.

mg de suelo	mL HCl (0,01 N)	mL NaOH (0,01 N)	% Nitrógeno	Promedio
250,3	15	2,85	0,68	0,67
250,3	15	3,04	0,67	
250,3	15	2,95	0,67	
250	15	2,96	0,67	
250,9	15	3	0,67	
250,5	15	3,05	0,67	

Tabla 21: Determinación del contenido de Nitrógeno en el suelo con residuo vegetal de 2 mm (T2) al final del estudio.

mg de suelo	mL HCl (0,01 N)	mL NaOH (0,01 N)	% Nitrógeno	Promedio
250,2	15	3,72	0,63	0,66
250	15	3,4	0,65	
250,7	15	3,17	0,66	
250,6	15	2,81	0,68	
250,2	15	3,25	0,66	
250	15	2,67	0,7	

Tabla 22: Determinación del contenido de Nitrógeno en el suelo con residuo vegetal de 1 cm (T3) al final del estudio.

mg de suelo	mL HCl (0,01 N)	mL NaOH (0,01 N)	% Nitrógeno	Promedio
250,5	15	3,34	0,65	0,65
250	15	3,55	0,64	
250,5	15	3,31	0,65	
250,3	15	2,92	0,68	
250,6	15	3,59	0,64	
250,6	15	3,47	0,64	

Tabla 23: Determinación de carbono orgánico en el residuo vegetal.

Crisol	Masa residuo	Masa residuo calcinado	% CO	Promedio	% CV
1	2,1336	0,2161	90,13	89,3	0,58
2	2,1358	0,2066	89,66		
3	2,1726	0,1991	89,09		
4	2,2083	0,1951	88,68		
5	2,1272	0,1963	89,16		
6	2,2761	0,2202	89,66		

Anexo 4

Datos experimentales de análisis de biodegradación

Tabla 24: Biodegradación de Atrazina en suelo (T1) (Datos correspondientes a Fig. 15)

Tiempo (días)	N° de repetición	Actividad (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
0,08	1	260,2	18,41	7,91	0,01	0,01
	2	216,1				
	3	239,2				
	4	215,9				
	5	232,2				
0,75	1	7009,7	601,8	9,22	0,45	0,46
	2	6496,9				
	3	7125,2				
	4	6186,3				
	5	5819,8				
1	1	5674,5	427,15	7,98	0,37	0,84
	2	5666,7				
	3	5578,6				
	4	5574,7				
	5	4922,1				

2	1	30372,6	1067,93	3,44	2,17	3,01
	2	29830,6				
	3	30372,6				
	4	32265,8				
	5	-				
4	1	39703,3	3521,57	9,32	2,65	5,66
	2	34390,4				
	3	36507,8				
	4	41003,2				
	5	41713,6				
7	1	24482,9	1319,39	5,07	1,82	7,48
	2	25570,3				
	3	27640				
	4	26200				
	5	-				
10	1	14927,2	1894,82	11,3	1,17	8,66
	2	17108,6				
	3	19062,4				
	4	17994,7				
	5	14746,2				

13	1	14351	388,6	2,66	1,02	9,68
	2	14190,7				
	3	15037,4				
	4	14482,7				
	5	15013				
18	1	11565,1	849,44	6,64	0,89	10,57
	2	13084,2				
	3	13056				
	4	13502,4				
	5	-				
25	1	17258,8	1381,38	8,02	1,20	11,78
	2	18577,3				
	3	17452,5				
	4	18254,8				
	5	18118,2				
33	1	12543,1	952,2	7,99	0,83	12,61
	2	10863,7				
	3	11866,6				
	4	12156,3				
	5	13785,5				

39	1	9517,7	870,77	9,92	0,61	13,22
	2	8887,7				
	3	9619,7				
	4	8656,2				
	5	9494,9				
46	1	8993,5	373,02	4,16	0,62	13,84
	2	9401				
	3	9301,8				
	4	9239,7				
	5	8750,7				
53	1	8164,5	718,2	8,83	0,57	14,41
	2	7791,4				
	3	8222,5				
	4	8200,6				
	5	9318,4				
60	1	7125,8	640,2	9,06	0,49	114,9
	2	7656,3				
	3	7481,1				
	4	7346,5				
	5	7510,8				

67	1	8098,1	721,32	9,16	0,55	15,45
	2	8991,4				
	3	8333,7				
	4	8435,3				
	5	7188,4				
74	1	7136,6	498,83	7,06	0,49	15,94
	2	7196,5				
	3	7514,1				
	4	6775,9				
	5	7804,3				
81	1	8287,1	638,8	8,58	0,52	16,46
	2	7631,5				
	3	8377,7				
	4	7877,5				
	5	7762				
88	1	6790,2	451,8	7,46	0,42	16,88
	2	6449,2				
	3	6582,9				
	4	6296				
	5	5883,7				

95	1	4226,3	231,6	5,6	0,29	17,16
	2	4404,3				
	3	3932,7				
	4	3965,3				
	5	4383,5				
102	1	4927,6	147,6	3,0	0,34	17,50
	2	5009,3				
	3	5051,1				
	4	4747,9				
	5	4730,6				
109	1	6205,5	436,7	7,5	0,41	17,91
	2	5714,8				
	3	5931,1				
	4	6234,1				
	5	5169,9				
124	1	5896,2	429,5	7,9	0,38	18,29
	2	5468,4				
	3	5037,1				
	4	-				
	5	-				

Tabla 25: Biodegradación de Atrazina en suelo con residuo vegetal de 2 mm (T2) (Datos correspondientes a Fig. 15)

Tiempo (días)	N° de repetición	Actividad (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
0,08	1	254,3	20,54	8,91	0,01	0,01
	2	255,7				
	3	213,6				
	4	230,5				
	5	222,6				
0,75	1	3833,6	510,47	14,74	0,24	0,25
	2	3949,1				
	3	3184,3				
	4	2888,2				
	5	-				
1	1	6333,1	619,59	9,63	0,45	0,70
	2	6596,9				
	3	6270,4				
	4	6091,6				
	5	7560,2				

2	1	30246,2	3125,9	10,7	2,05	2,74
	2	30714,4				
	3	28538,1				
	4	32375,4				
	5	24182,4				
4	1	35082,6	3121,75	10,23	2,14	4,88
	2	31633,5				
	3	26661,5				
	4	29242				
	5	29884,2				
7	1	29913,7	3327,48	12,26	1,90	6,78
	2	22310,2				
	3	28428,7				
	4	27871,8				
	5	-				
10	1	23404,4	3632,9	17,4	1,46	8,24
	2	23294,1				
	3	15649,3				
	4	21067,4				
	5	-				

13	1	9352,7	3872,8	30,3	0,89	9,13
	2	15192,1				
	3	16963,3				
	4	9628,5				
	5	-				
18	1	10636,3	1579,7	12,6	0,88	10,01
	2	10940,6				
	3	15191,2				
	4	12060,4				
	5	12304,8				
25	1	17660	1978,4	11,88	1,16	11,17
	2	17222,4				
	3	13559,9				
	4	14713,1				
	5	13559,5				
33	1	11525,7	1530,1	15,04	0,71	11,88
	2	8776,1				
	3	11550,8				
	4	8840,1				
	5	8628,4				

39	1	6270,5	484,2	7,35	0,46	12,34
	2	7334,5				
	3	6438,6				
	4	6791,5				
	5	6123,1				
46	1	6971,6	929,3	13,25	0,49	12,83
	2	8741,2				
	3	6545,1				
	4	6828,9				
	5	6496,1				
53	1	7371,9	1153,1	17,07	0,47	13,30
	2	8489,4				
	3	6064,6				
	4	6104				
	5	5740,5				
60	1	5417,8	424,7	7,83	0,38	13,67
	2	6093,1				
	3	5491,3				
	4	5050,4				
	5	5063,7				

67	1	5544	416,5	7,76	0,37	14,05
	2	6012,1				
	3	5018,5				
	4	5063,1				
	5	5186,7				
74	1	5949,9	495	9,37	0,37	14,41
	2	5344,8				
	3	4786,2				
	4	5515,8				
	5	4803				
81	1	5678,2	431,1	7,91	0,38	14,79
	2	5931,2				
	3	4953,4				
	4	5660,1				
	5	5039,1				
88	1	4809,5	300,4	6,54	0,32	15,11
	2	4371,6				
	3	4185,8				
	4	4893,3				
	5	4688,2				

95	1	3961,3	525,4	12,89	0,28	15,39
	2	4204				
	3	3846,3				
	4	3477,6				
	5	4890,7				
102	1	3660,1	121,0	3,42	0,24	15,63
	2	3573,6				
	3	3371,4				
	4	3535,2				
	5	-				
109	1	3981,9	695,3	15,17	0,32	15,95
	2	4031,7				
	3	4925,5				
	4	5629,9				
	5	4348,2				
124	1	3549,9	36,52	1,03	0,24	16,19
	2	3513,6				
	3	3586,6				
	4	-				
	5	-				

Tabla 26: Biodegradación de Atrazina en suelo con residuo vegetal de 1 cm (T3) (Datos correspondientes a Fig. 15)

Tiempo (días)	Nº de repetición	Actividad (dpm)	SD	CV (%)	CO ₂ (%)	CO ₂ (%) acumulado
0,08	1	214,5	14,5	7,63	0,01	0,01
	2	176,3				
	3	180,3				
	4	198,4				
	5	188,9				
0,75	1	4875,5	343,5	7,63	0,31	0,32
	2	4560,2				
	3	4720,6				
	4	4372,7				
	5	3987,6				
1	1	6170,3	627,5	10,28	0,42	0,74
	2	5693,3				
	3	5934,6				
	4	7152,7				
	5	5580,9				

2	1	28011,9	1501,4	5,13	2,05	2,79
	2	31082,7				
	3	29915,2				
	4	29853,8				
	5	27428,4				
4	1	33382,6	1823,8	5,58	2,29	5,09
	2	34848,6				
	3	33644,5				
	4	30544				
	5	31062,4				
7	1	29523,4	2714,4	9,64	1,97	7,06
	2	24084				
	3	29586,3				
	4	29425,7				
	5	-				
10	1	18114,6	1195,2	6,57	1,27	8,33
	2	17685,9				
	3	20441				
	4	17319,9				
	5	18343,1				

13	1	12528,71	1078,19	9,61	0,78	9,11
	2	11320,61				
	3	11080,86				
	4	11584,14				
	5	9554,06				
18	1	9612,29	1546,13	13,48	0,80	9,91
	2	13225,5				
	3	10966,59				
	4	12090,73				
	5	-				
25	1	14836,84	397,29	2,72	1,02	10,93
	2	13961,26				
	3	15004,98				
	4	14543,98				
	5	14554,42				
33	1	10954,95	1384,01	11,02	0,88	11,81
	2	12464,66				
	3	11785,19				
	4	11507,41				
	5	12103,07				

39	1	6013,67	966,94	14,74	0,46	12,27
	2	7411,81				
	3	7754,17				
	4	5524,21				
	5	6094,25				
46	1	5947,8	197,27	3,31	0,41	12,68
	2	5761,3				
	3	5891,88				
	4	6290,91				
	5	5916,35				
53	1	5728,75	712,83	11,02	0,45	13,13
	2	6600,2				
	3	5805,9				
	4	7439,53				
	5	6761,75				
60	1	4912,06	293,8	5,68	0,36	13,49
	2	5425,02				
	3	5492,75				
	4	5477,5				
	5	5178,26				

67	1	5979,52	286,32	4,63	0,43	13,92
	2	6017,89				
	3	6649,66				
	4	6007,44				
	5	6286,97				
74	1	5098,11	365,8	6,91	0,37	14,28
	2	5754,67				
	3	5601,89				
	4	5438,15				
	5	5476,71				
81	1	4988,88	372,26	7,48	0,34	14,63
	2	5018,17				
	3	4658,57				
	4	5559,28				
	5	4642,2				
88	1	4379,7	651,8	12,5	0,36	14,99
	2	5710,3				
	3	5271,9				
	4	4758,5				
	5	5953				

95	1	3523	419,8	10,82	0,27	15,26
	2	4394,8				
	3	4265,3				
	4	3692,3				
	5	3521,3				
102	1	4869,8	467,2	10,00	0,32	15,58
	2	4977,7				
	3	4119,9				
	4	-				
	5	-				
109	1	4220,3	292,4	7,1	0,28	15,86
	2	4379,1				
	3	4193,2				
	4	3702,9				
	5	-				
124	1	3305,0	164,1	4,7	0,24	16,10
	2	3613,1				
	3	3557,2				
	4	-				
	5	-				

Anexo 5

Datos para la demostración de cinética de reacción para ¹⁴C-Atrazina, orden 1.

Tabla 27: Determinación cinética de reacción de Atrazina en el suelo (T1).

Tiempo (Días)	Actividad (dpm)	mg de Atrazina	mg Atrz/50 g suelo	mg Atrz/Conc. inicial	Ln[Atrazina]
2	493939,773	0,722	4,478	0,861	-0,149
13	755286,372	1,104	4,096	0,788	0,239
19	812972,353	1,188	4,012	0,772	0,259
25	1041759,74	1,522	3,678	0,707	0,346
46	1065643,48	1,557	3,643	0,701	0,356
60	1115251,6	1,630	3,570	0,687	0,376
74	1123707,98	1,642	3,558	0,684	0,379
102	1146681,78	1,676	3,524	0,678	0,389
116	1163053,7	1,700	3,500	0,673	0,396

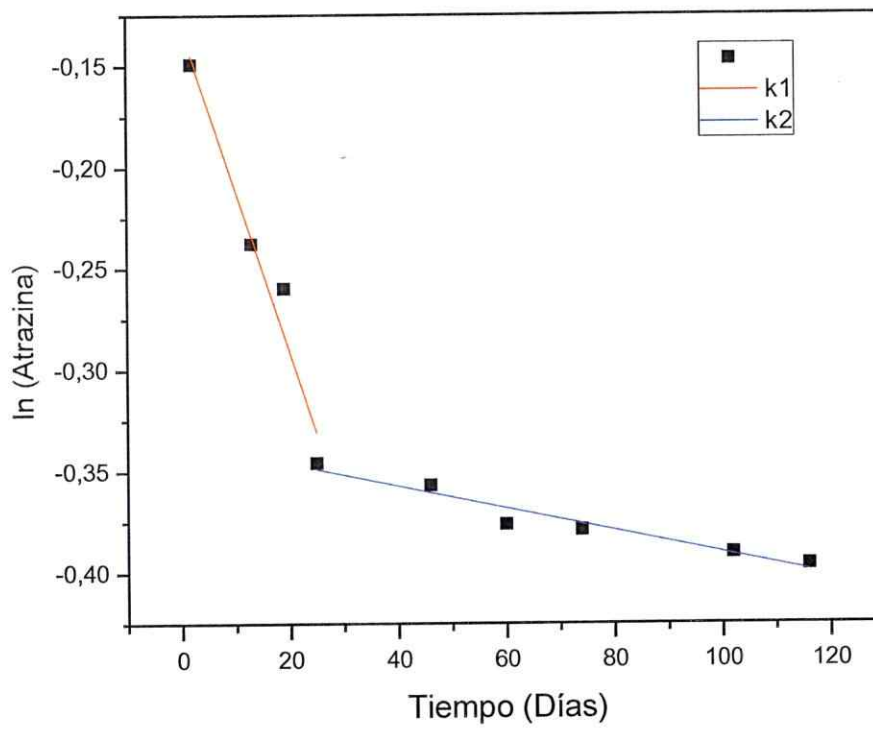


Figura 17: Cinética de primer orden para la degradación de Atrazina.

Fase 1:

$$Y = -0,0081x - 0,1294$$

$$K1 = -0,0081$$

$$R^2 = 0,9586$$

Fase 2:

$$Y = -0,0005x - 0,3399$$

$$K2 = -0,0005$$

$$R^2 = 0,8917$$

Anexo 6

Tabla 28: Disipación de Atrazina en el suelo (T1) (Datos correspondiente a Fig 16)

Tiempo (Días)	N° de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	Disipación (%)	SD	CV (%)
0	1	33082				
2	1	28236,4	28463,7	13,88	321,4	1,13
	2	28691				
	3					
	4					
13	1	26732,3	26054	21,22	662,2	2,54
	2	26304,1				
	3	26015,3				
	4	25164,4				
19	1	24351,6	25504,7	22,85	938,8	3,68
	2	26190,2				
	3	26344,8				
	4	25132,1				
25	1	23105,5	23397,2	29,37	505,4	2,16
	2	23065				
	3	23275,5				
	4	24142,7				

46	1	23491,8	23162,4	29,95	384,6	1,66
	2	22706,8				
	3	22980,9				
	4	23470,1				
60	1	20800	22715,3	31,34	1389,5	6,12
	2	22799,8				
	3	23161,4				
	4	24100				
74	1	23100	22645,6	31,58	1600,8	7,07
	2	23154,4				
	3	20325,7				
	4	24002,3				
102	1	21959,6	22460,0	32,22	376,0	1,67
	2	22723,0				
	3	22383,2				
	4	22774,2				
116	1	22087,0	22331,0	32,68	835,9	3,74
	2	23562,6				
	3	21710,1				
	4	21964,5				

Tabla 29: Disipación de Atrazina en el suelo con residuo vegetal 2. mm (T2)

(Datos correspondiente a Fig 16)

Tiempo (Días)	N° de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	Disipación (%)	SD	CV (%)
0	1	33082				
2	1	27892,2	28429,7	13,98	760,1	2,67
	2	28967,2				
13	1	25752,5	24747,7	25,19	934,7	3,78
	2	25321,4				
	3	23823,6				
	4	24093,2				
19	1	25566	24817,2	24,93	984,3	3,97
	2	25726,3				
	3	23718,7				
	4	24258				
25	1	22399,5	23087,8	30,21	890,2	3,86
	2	23129,6				
	3	22491				
	4	24331,1				

46	1	22750,6	22192,4	32,89	1285,9	5,79
	2	23321,6				
	3	22336,1				
	4	20361,3				
60	1	22491,5	21988,2	33,55	419,4	1,91
	2	22082,9				
	3	21897,3				
	4	21481				
74	1	21791	21440,8	35,23	493,7	2,3
	2	20866,8				
	3	21909				
	4	21196,3				
102	1	20576,8	21247,5	35,90	476,9	2,2
	2	21550,8				
	3	21239,9				
	4	21622,3				
116	1	21866,3	20857,5	37,16	739,3	3,5
	2	20955,0				
	3	20294,4				
	4	20314,1				

Tabla 30: Disipación de Atrazina en el suelo con residuo vegetal 1 cm (T3)

(Datos correspondiente a Fig 16)

Tiempo (Días)	N° de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	Disipación (%)	SD	CV (%)
0	1	33082				
2	1	29134,7	28901,8	12,55	329,3	1,14
	2	28669				
	3					
	4					
13	1	25823,6	2594	21,59	419	1,62
	2	25991				
	3	25455,2				
	4	26465				
19	1	24453,4	24864,5	24,79	1167,7	4,7
	2	23477				
	3	25328,7				
	4	26199				
25	1	23735,9	24229,3	26,75	540,8	2,23
	2	24900,8				
	3	23851,1				
	4	24429,2				

46	1	23938,1	22877,2	30,81	874,8	3,82
	2	21859,5				
	3	23114				
	4	22597,3				
60	1	21032,6	21520,9	34,96	526,1	2,44
	2	21452,1				
	3	22078				
	4	-				
74	1	20814	21076,3	36,34	351,5	1,67
	2	21594,4				
	3	20931				
	4	20965,1				
102	1	20475,2	20765,8	37,37	211,5	1,02
	2	20889,5				
	3	20950,5				
	4	20747,9				
116	1	20638,3	20548,9	38,09	224,9	1,09
	2	20248,8				
	3	20779,8				
	4	20528,7				